

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (115PT0)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 16 December 1999 (16.12.99)	
International application No.: PCT/JP99/03054	Applicant's or agent's file reference: 99P133WO
International filing date: 07 June 1999 (07.06.99)	Priority date: 08 June 1998 (08.06.98)
Applicant: YAMAMOTO, Hiroshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
06 August 1999 (06.08.99)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
_____2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP

US

特 許 協 力 条 約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条; PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 99P133WO	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03054	国際出願日 (日.月.年) 07.06.99	優先日 (日.月.年) 08.06.98
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 6 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-31, 39 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲29-31、39は、甲状腺癌の診断方法に係る発明であるから、人を診断する方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係る発明である。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takeuchi, T. et al. "Characterization of AE-6 Monoclonal Antibody Recognizing VHCSAGV Sequence in CD45 PTPase Domain" Tissue Antigens (1993) 第42巻 第4号 p.441	1-14
Y	Michel, S. et al. "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen" J. Exp. Med. (1988) 第168巻 第5号 p.1523-1530	1-28, 32-38
Y	Michel, S. et al. "Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region" EMBO J. (1992) 第11巻 第3号 p.897-907	1-28, 32-38

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Lawrence, P. F. et al. "Monoclonal Antibodies to the Human $\gamma 2$ Subunit of the GABA _A /Benzodiazepine Receptors" J. Neurochem. (1995) 第64巻 第3号 p. 1305-1311	6-26
Y	Faure, P. et al. "Diagnostic Features of Primary Malignant Lymphomas of the Thyroid with Monoclonal Antibodies" Cancer (Philadelphia) (1988) 第61巻 第9号 p. 1852-1861	27-28, 32-38
Y	金光修著「抗体工学入門」株式会社地人書館 (1994) p. 145-166	33-38
A	Shvero, J. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Study" Cancer (Philadelphia) (1988) 第62巻 第2号 p. 319-325	1-28, 32-38
A	Nelson, G. O. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: Immunohistochemical Study of 32 Cases" Am. J. Clin. Pathol. (1991) 第96巻 第1号 p. 15-24	1-28, 32-38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99P133WO	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03054	国際出願日 (日.月.年) 07.06.99	優先日 (日.月.年) 08.06.98
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 6 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-31, 39 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 29-31, 39 は、甲状腺癌の診断方法に係る発明であるから、人を診断する方法に該当し、PCT 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係る発明である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takeuchi, T. et al. "Characterization of AE-6 Monoclonal Antibody Recognizing VHCSAGV Sequence in CD45 PTPase Domain" Tissue Antigens (1993) 第42巻 第4号 p. 441.	1-14
Y	Michel, S. et al. "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen" J. Exp. Med. (1988) 第168巻 第5号 p. 1523-1530	1-28, 32-38
Y	Michel, S. et al. "Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region" EMBO J. (1992) 第11巻 第3号 p. 897-907	1-28, 32-38

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Lawrence, P. F. et al. "Monoclonal Antibodies to the Human $\gamma 2$ S ubunit of the GABA _A /Benzodiazepine Receptors" J. Neurochem. (1 995) 第64巻 第3号 p. 1305-1311	6-26
Y	Faure, P. et al. "Diagnostic Features of Primary Malignant Lymph omas of the Thyroid with Monoclonal Antibodies" Cancer (Phil a) (1988) 第61巻 第9号 p. 1852-1861	27-28, 32-38
Y	金光修著「抗体工学入門」株式会社地人書館 (1994) p. 145-166	33-38
A	Shvero, J. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Clinical, His tologic, and Immunohistochemical Study" Cancer (Phila) (1988) 第62巻 第2号 p. 319-325	1-28, 32-38
A	Nelson, G. O. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: Immunohistoc hemical Study of 32 Cases" Am. J. Clin. Pathol. (1991) 第96巻 第1号 p. 15-24	1-28, 32-38

THIS PAGE BLANK (11SPT0)

社団法人
日本技術士会
監修

ニュー エンジニアリング ライブラリー

抗体工学入門

技 術 士

金 光 修 著

地 人 書 館

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 DDS (drug delivery system, 薬物送達システム) への抗体の利用

すべての医薬品の理想は、標的組織あるいは標的細胞に対してだけ作用し、他の組織や細胞には正負の如何なる作用も及ぼさないことである。このことは、とくに、抗がん剤のように標的細胞を殺滅するタイプの薬剤においては必須の要件となる。抗がん剤以外にも、自己免疫疾患の原因となっている免疫系の特殊な細胞クローンだけを除去したいような治療では、標的指向性の高い薬剤でなければ、副作用の点から使用が制限される。

抗体は、本来、生体に存在する生体防御機構をになう物質であり、抗原と結合して抗体・抗原複合体をつくり、補体あるいはマクロファージなどの細胞の連携によって抗原を溶解・破壊する。抗体として適切なものを使用すれば、抗体だけを投与してもがん細胞の抑制に働く場合も認められている [たとえば、Bリンパ球性白血病に対するオーダーメイドのモノクローナル抗体 (抗イディオタイプ抗体) によって白血病の進行が阻止された¹⁾]。しかしながら、一般には、モノクローナル抗体の単独投与では、がん細胞に対する抑制効果は弱い。これにはさまざまな理由が考えられる。

- (1) モノクローナル抗体が十分な濃度でがん細胞まで到達しない。
- (2) モノクローナル抗体の宿主による代謝が迅速に起こるため、大量を継続的に投与しなければならない。
- (3) がん細胞膜表面に発現している対象抗原の発現量がもともと低いか、あるいは治療に応じて発現量を低下したり、質的に変化したりする。
- (4) 使用する抗体がマウス由来のものでは、補体あるいはマクロファージなどの宿主の連携作用が弱い。
- (5) 抗マウス免疫グロブリン抗体が生成して、使用抗体を無効にしたり、副作用を起こすこともある。

このような点から、効果を高めるために、モノクローナル抗体は単に標的細

THIS PAGE BLANK (USPro)

胞への誘導作用に用い、標的細胞の破壊には他の薬物を利用する、モノクローナル抗体-作用薬物複合体からなる標的指向性薬剤の開発が盛んになった。

誘導性ミサイルのように、標的指向性をもつ薬剤 (magic bullet, 魔弾) のアイディアは、抗体の存在が明らかになった当初から描かれていた。抗体を抗原特異的細胞破壊薬剤として利用する上での抗体の使用形態としては、表 6.1 に示すような形態が考えられる。

【表 6.1】モノクローナル抗体の利用法
—抗原特異的細胞破壊薬剤としての利用形態概念図—

No.	利用形態	概念図	メ モ
1	非標識抗体	 免疫グロブリン完全分子 (Fab部の抗原結合性ととも、②、③ではFc部の生物活性を期待)	① 標的抗原への結合による抗原の生物活性消失。 ② 体内の補体系の共同作用による標的の破壊。 ③ 体内のFc受容体保持細胞障害性細胞によるADCC作用。
2	非標識抗体の断片分子	 F(ab') ₂ , Fab, Fabc	① 標的抗原への結合による抗原の生物活性消失 (効果の期待値は低い)。
3	薬剤結合-標的指向性 (抜身型薬剤)		① 抗体の抗原結合特異性と薬剤の標的細胞破壊能力との組み合わせによるミサイル型薬剤。
4	薬剤含有微粒子結合-標的指向性 (被覆型薬剤)		① 薬剤をリポソームあるいは合成高分子微粒子に抱合させて、抗体分子と結合。 抗体1分子に対する輸送薬剤量を増加させるとともに、輸送中の事故による目的以外の細胞破壊を避けることも期待。
5	局所におけるプロドラッグ活性化を狙う標的指向性 (局所活性化型薬剤)		① 抗体に結合する物質は、直接に標的破壊に働くのではなく、無差別破壊性薬剤のプロドラッグを別に用い、抗体集積場所でプロドラッグを活性化する働きをもつものを抗体に結合。

6. 1 標的指向性薬剤の開発

どの研究をもって標的指向性薬剤開発の始まりとするかには異論があろう

THIS PAGE BLANK (USPTO)

が、少なくとも、G. Mathe らの研究 (1958年)²⁾ は、はっきりとその概念のもとに進められたものといえよう。彼らは、白血病マウス (L 1210 細胞白血病) を用い、ハムスター抗 L 1210 細胞抗体に抗がん性薬物アメトプテリンを結合して治療実験を行った。しかし残念ながら、薬物の抗体への結合法に難があり、この実験結果は劇的な効果を示すには至らなかった。

十余年を経て、クロランブシルを結合した抗体を用いた T. Ghose ら³⁾ の研究 (1972年および以降) が功を奏し、以後作用薬物として、アドリアマイシン、ビンデシンおよびブレオマイシンなどを用いた例がつぎつぎに発表された。また一方、DNA合成阻害剤に代わって生物毒素を作用薬物として用いる研究も出てきていた (この当初の研究はオタフクカゼ・ウイルスにより細胞表面に発現された抗原に対する抗体を用いたもの)。標的指向性抗体に毒素タンパク質を結合した複合体をイムノトキシン (immunotoxin) とよぶ。図 6.1 に作用薬物の構造を、図 6.2 および図 6.3 に薬物の抗体との主な結合方法を示した。

6. 2 標的指向性薬剤の直面している課題

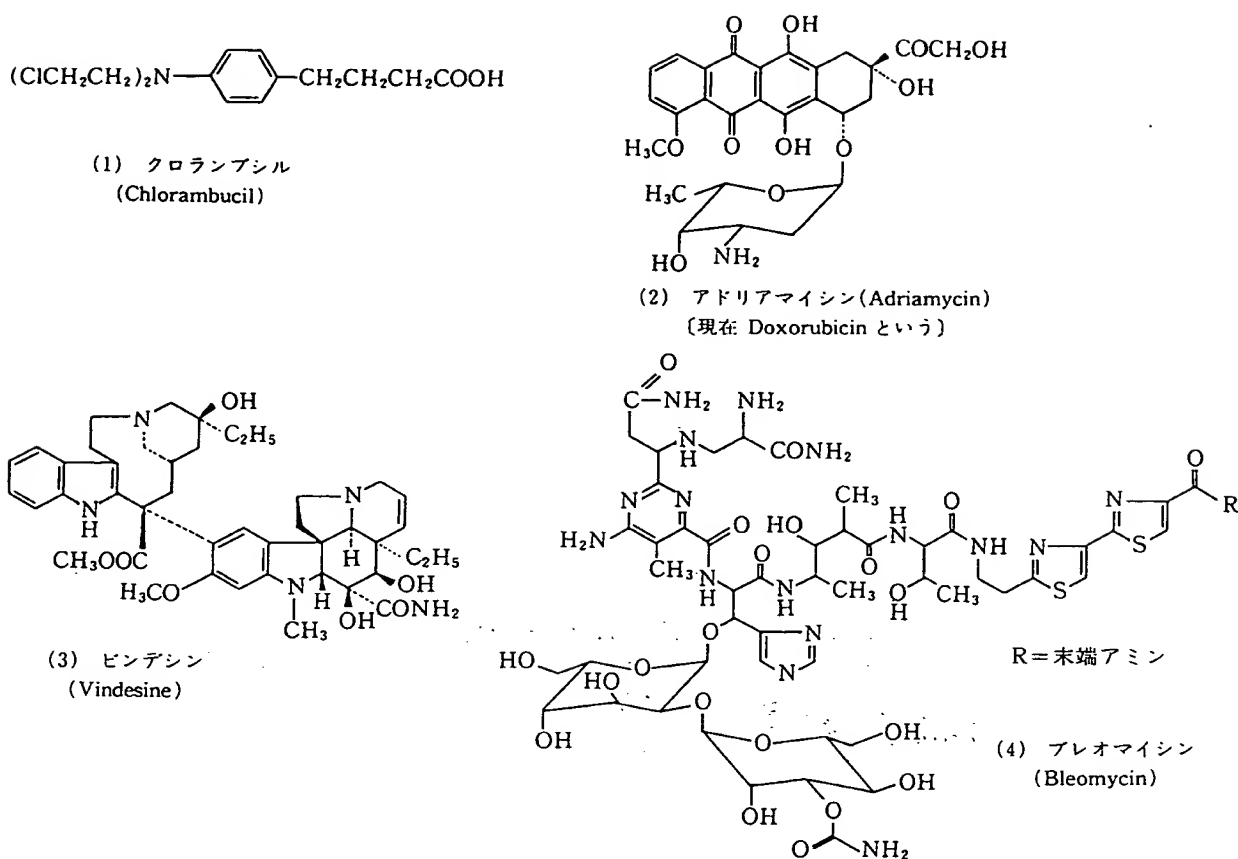
初期の実験的研究では、標的指向性薬剤の開発に対して大きな期待を抱かせるのに十分な結果が得られ、タイミングよく、細胞融合によるモノクローナル抗体調製法が開発された。モノクローナル抗体の特長の一つは、免疫グロブリン分子種の均一なものを利用できる点にある。このモノクローナル抗体の抗原特異性の高さに対する期待は大きく、多数の腫瘍特異抗原に対するモノクローナル抗体が分離され、標的指向性薬剤に関する膨大な研究が積み重ねられてきた。

それにもかかわらず、現在、なお、モノクローナル抗体を標的指向物質とする標的指向性薬剤は実用化の域に達していない。この理由は何であろうか。標的指向性薬剤の直面している問題点を以下に要約してみる。

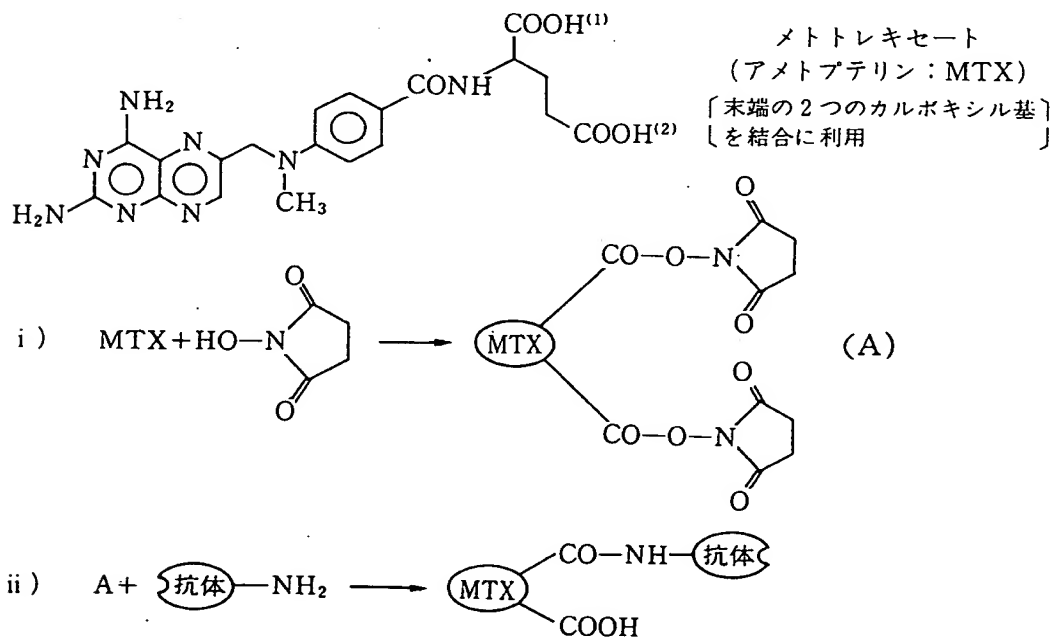
(1) 抗体の抗原特異性の問題

モノクローナル抗体の調製が、細胞融合法によって普及したが、モノクローナル抗体であっても、抗原特異性が生体内での使用にはまだ十分でない、とい

THIS PAGE BLANK (USPTO)

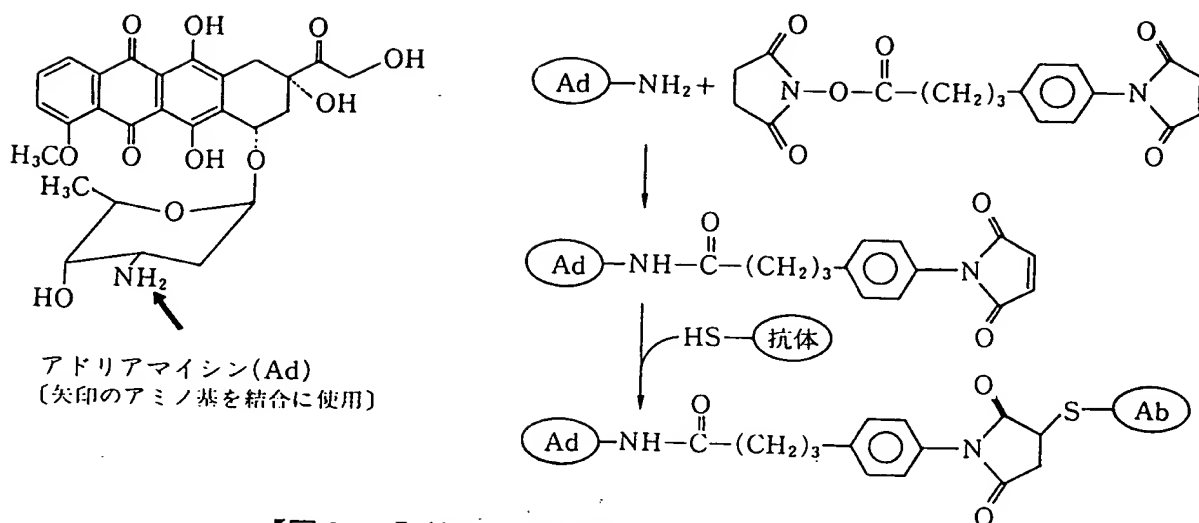


【図 6. 1】 標的指向性薬剤創製に用いられた抗がん剤の構造



【図 6. 2】 抗がん剤の抗体への結合方法 (1)
メトトレキセートの抗体との結合例

THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図 6.3】抗がん剤の抗体への結合方法 (2)
アドリアマイシンの抗体との結合例

うよりも、むしろ完全にがん（腫瘍）特異的といえる抗原が存在しないことがわかってきた。抗腫瘍性抗体として分離された抗体は、多少の差はあるにしてもそのほとんどが腫瘍以外の細胞とも反応性を示す。

(2) 作用薬物の問題

抗がん剤として一般に使用されているような薬物では、1個の細胞殺滅に多数の分子を必要とし、抗体との結合比が小さい場合には、標的指向性薬剤1分子あるいは数分子くらいでは、細胞殺滅に必ずしも十分でない。抗体に多数の抗がん性薬物を結合すれば、抗体の標的親和性が失われる。毒素の場合には、酵素作用によりリサイクルして多重効果を示すので、理想的な薬物と考えられるが、毒素自身の標的親和性の問題、あるいは固有の標的親和性を除去した毒素サブユニットの場合にも、非特異的局在性の問題を克服できない。

(3) 有効性の問題

作用薬物の効力のほかに、標的指向性薬剤は、標的細胞に到達するまで、体内での輸送中において非特異的結合を起こしたり、抗体と作用薬物との結合が切断されることがあってはならない。標的細胞に到達した後は細胞に容易に取り込まれ、取り込まれてからは抗体との結合が切断されることを期待されるが、作用薬物自身は作用標的に到達するまで分解されることなく、細胞障害性を十分に発現できなければならない。生体内輸送中に非特異的結合を起こしたり、抗体と作用薬物との間の結合が切断すれば、期待する効果が得られないだ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

けでなく、副作用を発現する。標的細胞周辺に接近した後の細胞内への取り込み、および作用の発現までの被分解性も大きな問題である。

(4) 抗体と薬物との結合性の問題

抗体の抗原結合性と特異性、および薬物の作用を消失することのない結合法であることが要求される。さらに、標的細胞に到達するまではその結合が生体内条件（酵素作用など）で切断を受けず、しかも、細胞内に取り込まれてからは切断を受けることが望ましい。このような結合形成のための結合剤の開発・選択が要求される。

(5) 生体の異物代謝排泄機能の問題

ミサイル型医薬品は、生体により異物として認識され、急速に網内系（reticuloendothelial system）にトラップされ、分解を受けて排泄される。そのため、作用薬物により網内系細胞（主としてマクロファージ）、肝臓あるいは排泄器官たる腎組織などが障害を受ける。

(6) 抗イムノトキシン抗体の生成

イムノトキシンは継続使用が予想されるので、標的指向性抗体、毒素あるいは結合部に対して、被投与者に抗体が生成するおそれがある。

6. 3 標的指向性薬剤開発の現状と動向

前節に要約した問題点をすべてクリアすることにより、初めて理想的な標的指向性薬剤（ミサイル型医薬品）が実現する。このような問題点を認識した上で、これらの問題を一つ一つ克服するために、現在、地道な努力が傾けられている。以下に開発状況の一端を紹介する。なお、DDSの開発には、標的指向性物質は細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体に限られることなく、受容体のリガンド物質、接着性タンパク質あるいは糖質なども用いられ、良好な臨床効果を示すことが報告されたものもある。ここでは、標的指向性物質としてモノクローナル抗体を利用する場合に絞って話を進める。

6. 3. 1 抗体の問題

腫瘍特異性抗原が存在しないとなれば、モノクローナル抗体を標的指向性物

THIS PAGE BLANK (USPTO)

質とする抗がん性ミサイル型薬剤のアイディアは、崩壊の危機にあることになる。次善の策としては、副作用のより少ない抗体を選ぶ以外に手がない。モノクローナル抗体の調製法としては、細胞融合法以外に遺伝子工学的手法による調製法が開発されてきたことから、この方法の進展によって細胞融合法で得られる抗体よりも、より特異性に優れたモノクローナル抗体の調製が可能になることを期待したい。

しかしながら、腫瘍その他の標的細胞に対する完全に特異的なモノクローナル抗体が得られないならば、次善の策として、標的指向性薬剤自身に工夫を加えて、より特異性が高くなるような剤型とするか、あるいは臨床使用上において工夫を加えなければならない。いわゆる、効果対副作用の比を高める臨床使用法が必要となる。

腫瘍細胞は環境条件に応じて表面抗原を変化する能力をもち、当初は有効であった抗体が有効性を消失することも多い。腫瘍特異性の高い抗原に対するモノクローナル抗体の選択、表面抗原の変化に対処する複数のモノクローナル抗体の準備、あるいは数種のモノクローナル抗体を用意して、当初から計画的に使用するなどの対応が必要となろう。また、使用するモノクローナル抗体がヒト型でない点も薬剤としての普及には重要な問題である。

前節での問題点として把握した場合に(3)の有効性の問題の項で取り上げたが、モノクローナル抗体を標的指向性物質とする標的指向性薬剤の効力は、使用するモノクローナル抗体によって大きな差を生じることがあること、および細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体のうち、有効な標的指向性薬剤をつくることができるのは、約1/3程度といわれる。この現象解明について検討が行われた。

まず、同一抗原に対するモノクローナル抗体で比較してみると、細胞膜により近いほうのエピトープに対する抗体のほうが、細胞膜から遠いエピトープに対する抗体よりも活性の高い標的指向性薬剤を調製することができた。たとえば、ヒト・リンパ球T細胞のCD 2分子(Eロゼット受容体)に対するモノクローナル抗体では、同程度の結合親和性をもつが、結合エピトープの位置の異なるもの(細胞膜に近いエピトープに対する抗体RFT 11-Aおよび細胞膜から遠いエピトープに対する抗体35.1-Aおよび9.6-A)を使用してリシン

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A鎖と結合した複合体の比較で、RFT 11-A複合体は35.1-Aあるいは9.6-A複合体の100～1,000倍のT細胞障害活性を示した⁴⁾。また、マウス・リンパ球B細胞の膜発現IgD (sIgD) に対するモノクローナル抗体では、抗 δ Fc複合体のほうが、抗 δ Fdの約100倍高いB細胞の障害活性を示した。なお、リソソーム指向性薬剤クロロキンの存在下では、抗 δ Fd複合体の活性は約100倍上昇し、抗 δ Fc複合体と同等の活性を示した⁵⁾。

細胞表面抗原エピトープの細胞膜からの遠近によって障害活性にこのような大きな差をもたらす原因として、O. W. Press ら⁴⁾は、細胞表面に結合した複合体は、両者ともに迅速に細胞内に取り込まれるが、細胞内への取り込みが原因ではなく、細胞内へ取り込まれてからの細胞内運命（輸送経路）に差があるためであると説明している。すなわち、複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれ、当初はエンドソームとして存在するが、リソソーム小胞との融合によってエンドリソソームとなる。エンドリソソームの運命には3種類あり、表面膜のものの位置に復帰するか、さらにリソソームとの融合によって完全にリソソーム化するか、あるいは表面膜のものの位置とは別の場所に輸送される (transcytosis, 細胞質横断)。標的指向性薬剤の作用薬物が細胞に対する致死作用を発現するためには、エンドソームあるいはエンドリソソーム内の作用薬物が細胞質に輸送（漏出あるいは積極的汲み出し作用）されなければならない。リソソーム内ではリソソーム酵素の作用を受け、リシンA鎖は分解されて作用を失う。このリソソームへの併合あるいはリソソーム内での分解速度が複合体によって異なることを示した。リソソーム併合あるいはリソソーム内での分解速度に差を生じる原因については明らかにされていない。

6. 3. 2 作用薬物の問題

作用薬物については、標的細胞に到達する薬物の量が非常に少ないことから、数分子、できれば1分子で細胞を完全に傷害できるようなパンチ力に富む薬物が期待され、細菌毒素あるいは植物毒素が用いられることが多くなってきた。毒素については第6.5節で述べる。

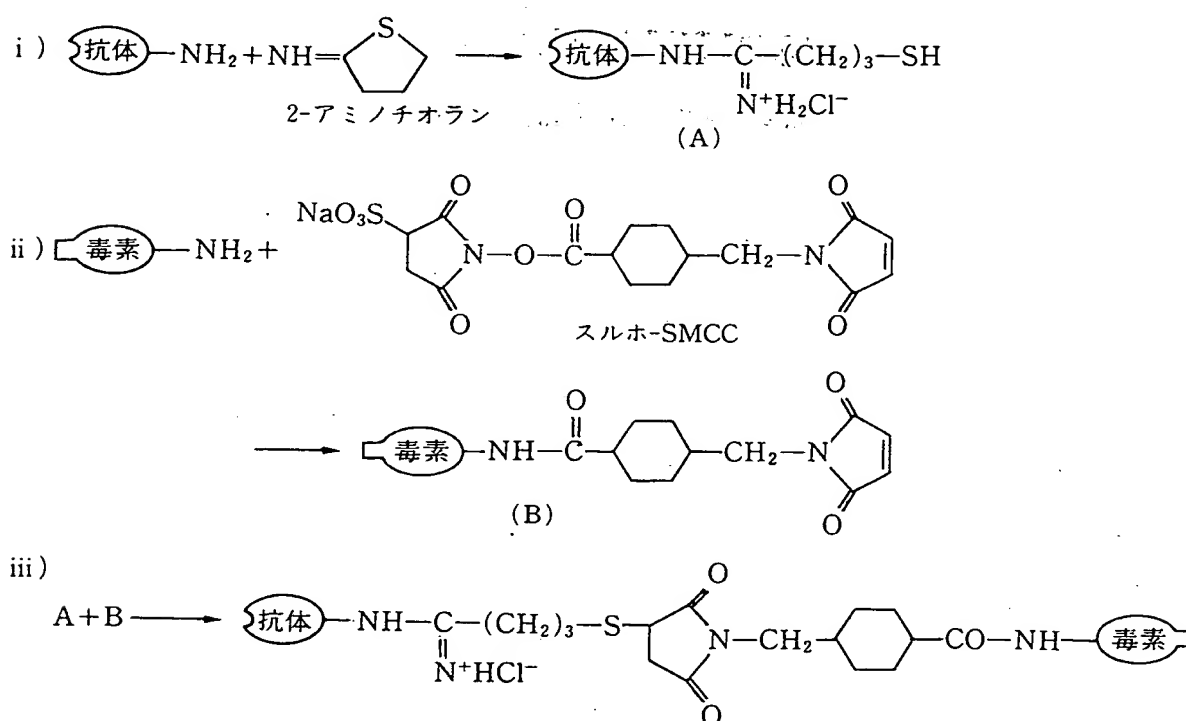
THIS PAGE BLANK (USPTO)

6.3.3 有効性の問題

作用薬物としての毒素については第6.5節で述べる。標的親和性物質としてのモノクローナル抗体の問題については、6.3.1で述べた。

6.3.4 抗体と薬物との結合の問題

薬物が低分子化合物の場合は、抗体との結合に、活性に影響を及ぼさない置換基あるいは側鎖を用いる（図6.4、図6.5および図6.6参照）。

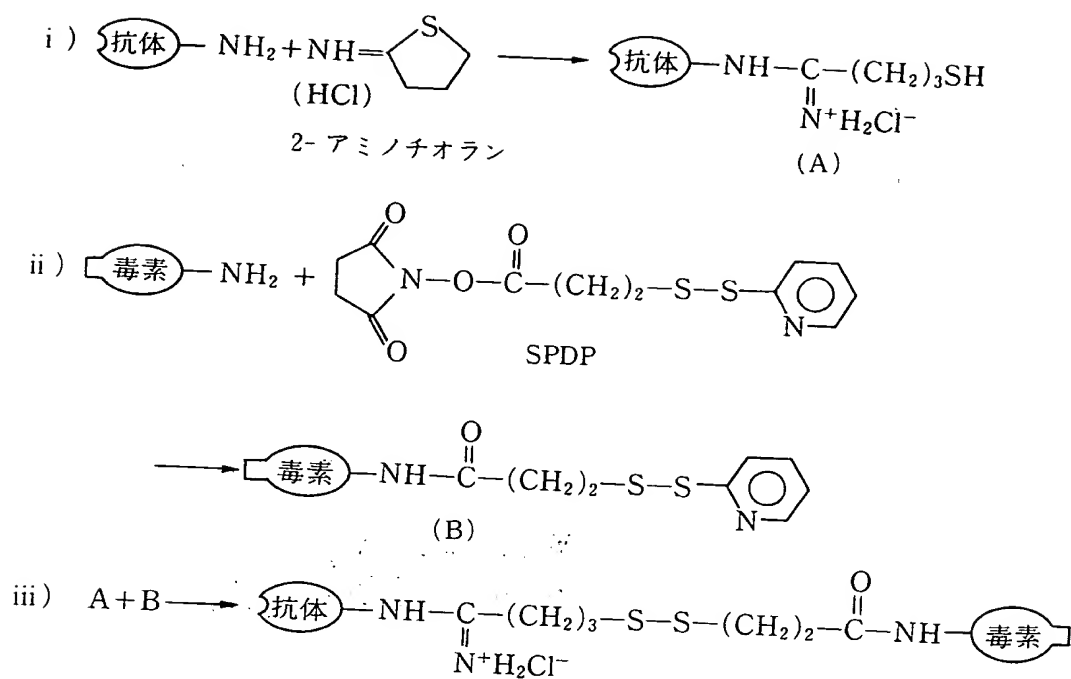


【図6.4】抗体全分子の毒素への結合例（ジスルフィド結合）

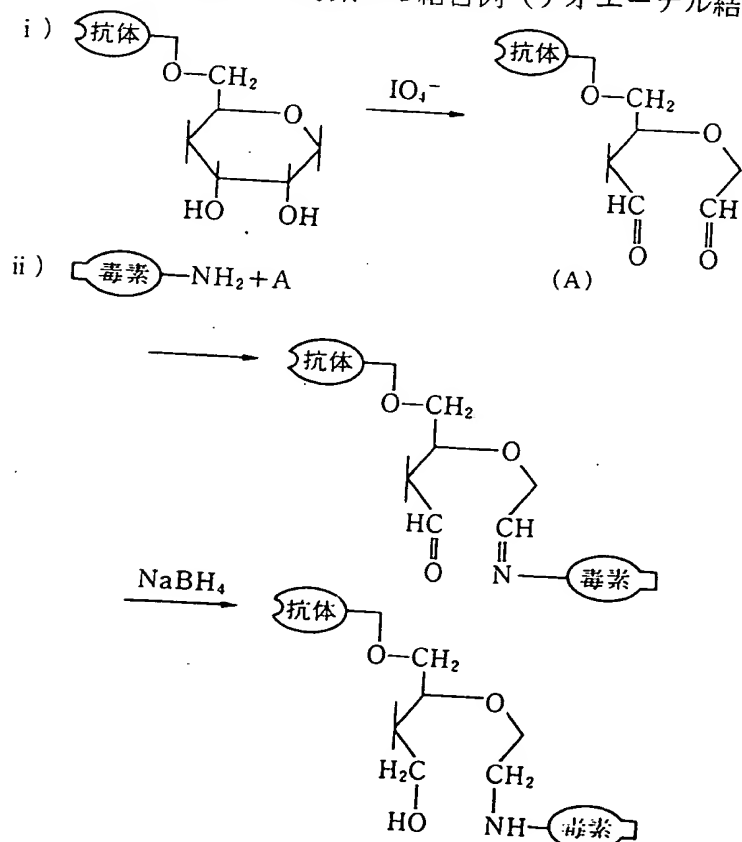
1分子の標的指向性物質で運ばれる作用薬物量を増やし、かつ輸送中の非特異的反応を抑制する方法として、モノクローナル抗体-薬物封入体複合体が開発されている。

薬物封入体の抗体分子との結合は、抗体に酵素標識を行うのと同様の方法で実施できる。問題は標的細胞への到達までに結合が絶対に開裂しないこと、および標的細胞に取り込まれてから結合の切れることが望まれる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図 6. 5】抗体全分子の毒素への結合例（チオエーテル結合）



【図 6. 6】抗体全分子の毒素への結合例（糖鎖への結合）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6.3.5 生体の異物代謝排泄機能の問題

抗体には、抗原結合部位 (Fab) および免疫機能発現に関与する Fc 部とが構造上離れて存在する。DDS の標的指向性機能には、抗原結合部位が作用するから、この目的には Fab あるいは Fv 部分だけでよい。Fc 部分はむしろ非特異的結合を起こす可能性をもつことから、標的親和結合機能に特化して用いる場合には、存在しないほうがよい。

異物代謝排泄機能の問題点は、抗体の抗原結合特異性により標的指向性をもたせようとする薬剤 (複合体) が、抗体の抗原結合性とは無関係に代謝排泄系組織に集積されることである。一般に肝臓や腎臓に非特異的な局在性を示し、これらの組織での非特異的細胞障害が副作用として問題となる。この点からも、標的親和結合機能を利用する抗体は Fc 部を含まず、できるだけ小分子断片であるほうがよい。

異物代謝排泄に関するもう一つの問題は、薬物封入体である。標的親和物質 (モノクローナル抗体あるいはその部分構造物) 1 分子に対して多量の低分子化合物を結合するために (および輸送中の副作用防止のために) 薬物封入体を用いる。薬物封入体としては、リポソーム (脂質膜小胞) あるいは合成生分解性ポリマーなどによるマイクロカプセルが使用される。

リポソームは、単層および多重層からなる脂質の小胞を、サイズおよび組成に関していろいろと変化させたものを調製できる。さらに pH 感受性をもたせたり、薬物の遊離速度制御などができる工夫も加えられてきている。一方、欠点としては、安定性に問題があり、水溶液中での長期保存に耐えにくい (リン脂質の酸エステル結合の加水分解、融合、水溶性薬物の漏出など) という問題をかかえている。これらの問題の一部は、新しい凍結乾燥法の手段によって克服されているものもある。なお、標的親和性抗体とリポソームとの結合複合体をイムノリポソーム (immunoliposome) ともいう。

マイクロカプセルの合成ポリマー素材としては、ポリ乳酸、ポリアミノ酸および乳酸とグリコール酸のコポリマー、乳酸と ϵ -カプロラクトン、N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、ポリオルトリン酸エステルおよびポリ芳香族・脂肪族酸無水物などが用いられている。マイクロカプセルはサイ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ズ、交差結合材料、親水性・疎水性特性（バランスおよび散在性）、吊り下がり側鎖および薬剤との結合のためのスペーサーなどが工夫されている。天然素材、すなわち、多糖類（でん粉、セルロース誘導体など）およびタンパク質（アルブミン、コラーゲン、ゼラチンなど）も用いられる。動物由来のリポタンパク質は、天然の脂質キャリア（担体）であり、脂質親和性薬剤のキャリアとして好適である。

マイクロカプセル薬物封入体は、体内で内皮バリアーを通過できない。血管内に注入された粒子は、そのまま血管内にとどまり、内皮下に存在する細胞層には到達できない。このため、適用法として組織内注入をはかる必要がある。固形がんの腫瘍中への浸透も別の問題として存在する。

網内系（主としてマクロファージ）による粒子取り込み（endocytosis）も大きな問題である。マイクロカプセルおよびリポソームは、食作用によって食細胞に取り込まれ、分解作用を受ける。網内系の食細胞は、貪食能だけでなく、細胞表面との親和性によっても粒子を取り込むので、マイクロカプセルあるいはリポソームの表面構造の修飾も、網内系でのトラップの問題を回避するために必要な条件となる。その一つの解決策として、リポソーム表面へのシアル酸残基の導入により網内系の認識除去を低減できるといわれる。粒子サイズをさらに小さくすること（100nm以下）も有用であろう。

6. 4 標的細胞に到達した標的指向性薬剤の運命

標的指向性薬剤が、目的の標的細胞表面に到達してからの運命はどうなるのであろうか。吸着物の細胞内取り込み（endocytosis）は、表面抗原に結合した抗体が細胞によって取り込まれる一般的なプロセスである。細胞表面受容体に結合したリガンド（受容体・リガンド複合体）は、coated pit（被覆ピット）と名付けられた細胞表面の位置から細胞内に取り込まれる。しかし、中には、被覆ピットに集結せず、したがって、細胞内に取り込まれない複合体もある。細胞表面抗原に特異的結合性をもち、標的細胞に到達性をもつ抗体は、標的指向性抗体であるが、DDSの観点からは、不十分な場合もあることとなる。また、標的細胞の表面抗原であっても、その抗原が細胞表面にきっちりと固定

THIS PAGE BLANK (USPTO)

されたものでない場合には、生体液中に脱落した遊離状態の抗原により、複合体が標的細胞に到達する前の輸送途中にトラップされて作用を消失したり、あるいは抗体・抗原複合体として副作用を誘起することとなる。

細胞表面（被覆ピット部分）からの細胞内取り込みは、細胞膜（脂質二重膜）が内部に陥入し、くびれの部分が切断されることによって細胞内小胞（endosome）として存在することになる。エンドソーム内のpHは、膜にあるATPポンプによって通常微酸性（pH 5～6）となる。エンドソームにリソソーム顆粒が融合してエンドリソソームとなり、あるいはさらに完全にリソソームに併合されることでリソソーム酵素の作用を受けて薬物複合体結合が切断され、薬物自身も分解を受ける可能性がある。したがって、薬物は低pHおよびリソソーム酵素の作用により効能に影響を及ぼすような分解を受けない構造のものでなければならない。あるいはリソソーム酵素（酸性で働く加水分解酵素群）で分解される前に、細胞致死作用を発現できるものでなければならない。このようにして細胞内で活性状態を保持する薬物も、細胞内に到達した分子数で、当該細胞が増殖・分裂する以前に細胞を死に導き得るものでなければならない。

エンドソーム内包分子（表面抗原－リガンド結合体）の細胞内運命については、第6.3.1項で述べたように、3通りのパターンがある。①本来存在していた膜位置に戻る、②リソソームに送られて分解される、③本来存在していた膜位置とは異なる膜部分に送られる。これら3種類の経路のいずれをたどるかは、内包物に依存するといわれる。したがって、標的指向性薬剤－標的抗原複合体の性質によって、細胞内への取り込みは同様に起こっても、細胞障害能の異なることが十分に可能である。第6.3.1項で抗体の問題として取り上げた同一細胞表面抗原に対する抗体であっても、エピトープの差によって有効性に差を生じた理由もこのためであろう。

6. 5 標的指向性薬剤の作用薬物として使用される毒素

標的指向性薬剤の作用薬物として最初に用いられたのは、ジフテリア毒素である⁶⁾。ジフテリア毒素は1分子でも細胞を殺滅する効力をもち、ほぼ理想的

THIS PAGE BLANK (USPTO)

な作用薬物と考えられるが、一般にヒトでは、ジフテリアに対する抗体が存在するため、臨床使用には適さないと考えられ、同等以上の効力をもつ代替品の開発が求められていた。植物毒素であるリシンあるいは緑膿菌の菌体外毒素である *Pseudomonas* exotoxin A (PE) が実用性のある作用薬物として期待されている。表 6.2 に標的指向性薬剤開発に用いられている代表的な毒素を

【表 6.2】標的指向性薬剤創製に用いられる代表的な毒素

毒 素	分子量	機能単位(aa*5)	主要な機能
ジフテリア毒素*1	58,342	A鎖 (193) B鎖 (342)	タンパク質合成阻害(ADPリボシル化触媒活性)。 細胞膜への挿入機能および細胞受容体への結合能。
リシン(D)*2	(592aa*5)	A鎖 (267) B鎖 (262)	タンパク質合成阻害(リボソーム28SrRNAの特異的N-グリコシダーゼ活性)。 糖鎖結合作用・細胞凝集作用
シュードモナス外毒素*3	約66,000	I II III	細胞の受容体への結合能。 細胞膜への挿入機能。
SCRIP*4		1本鎖	タンパク質合成阻害(ADPリボシル化触媒活性)。 リシンA鎖と同様の作用(特異的N-グリコシダーゼ活性)。

*1) ヒトには一般に抗体ができていない(予防接種による)。

*2) リシンと類似の毒素にアブリンがある。

*3) ヒトへの一般毒性は低い。

*4) リシンA鎖様一本鎖リボソーム不活性化タンパク質(single chain ribosome inactivating proteins)には比較的多数の種類がある。B鎖をもたないので、単独では毒性が低い。ゲロニン、サボリン、PAPおよびその他のSCRIPを用いたイムノトキシンが報告されている。

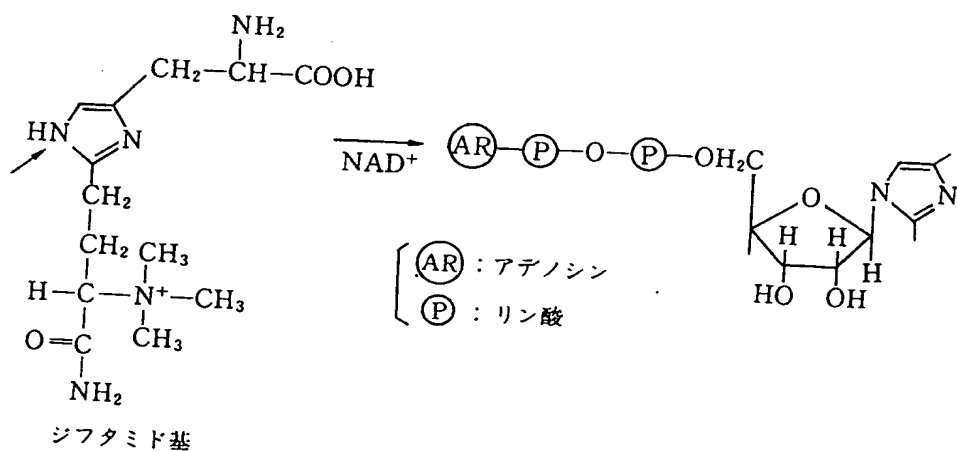
*5) 構成アミノ酸残基数。

まとめた。天然に存在する毒素は、一本鎖リボソーム不活性化タンパク質(single chain ribosome inactivating proteins, SCRIP) 以外には、毒作用を発現するタンパク質合成阻害活性構造部分の他に、細胞への接着および細胞膜への挿入作用をもつ構造部分をも含む。標的指向性薬剤調製のためには、毒素自体の細胞接着性は不要というよりもむしろ悪影響を及ぼすことがあるので、タンパク質合成阻害活性をもつ構造部分だけを利用しようとする方向にある。ただし、細胞への取り込みあるいは細胞内へ取り込まれたのち、エンドソーム内部から細胞質への輸送に、毒素の細胞膜挿入促進構造部分が大きな効果を示すことも示されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6. 5. 1 ジフテリア毒素

ジフテリア毒素は、535アミノ酸残基からなる一本鎖ポリペプチド（分子量 58,342）で、トリプシンにより193, 194アミノ酸残基の間が切断される。N末端側（1-193）をA鎖、C末端側（194-535）をB鎖という。しかし、A鎖186およびB鎖201の両システイン残基によるジスルフィド結合によりA・B両鎖は連結していて、還元によって初めてA鎖とB鎖が分かれる。A鎖（分子量 21,150）には、細胞を死に導くタンパク質合成阻害作用を起こすADPリボシル化触媒活性がある。Glu148が活性に関与していて、Aspに置換すると活性は1/100以下に低下する。B鎖（分子量 37,192）のN末端側に膜挿入機能、C末端側に細胞受容体への結合能がある。A鎖のADPリボシル化反応は、ポリペプチド鎖延長因子EF-2のジフタミド（diphthamide）基のイミダゾール核のN1に起こる（図6.7）⁷⁾。



【図6.7】ジフタミド基へのADPリボシル化反応*

B. G. Van Ness, et al. : *J. Biol. Chem.*, 255, 10710 (1980), Fig 1と2から改変。

D. P. Williams ら⁸⁾は、インターロイキン-2 (IL-2) とジフテリア毒素との複合体を遺伝子工学的に調製し、そのIL-2受容体保持細胞に対する細胞障害性を調べた。ジフテリア毒素のN末端から485番のアラニン残基 (Ala 485) までを含む複合体、および388番アミノ酸残基までを含む複合体はIL-2の細胞内への挿入が起こったが、ジフテリア毒素294番アミノ酸残基までの複合体では作用が非常に弱かった。すなわち、ジフテリア毒素断片Aの細胞質への輸送には膜透過ドメイン(Thr 301-Phe 369)の必要性が示された。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6. 5. 2 リ シ ン

リシン (ricin) はヒマ (*Ricinus communis*) 種子中に存在するタンパク質性毒素で、細胞凝集活性を併せもっている。529 アミノ酸残基からなるポリペプチドであって、A鎖およびB鎖2本のサブユニットが、A鎖(Ile1-Phe 267)のCys 259とB鎖(Ala 1-Phe 262)のCys 4によりジスルフィド結合で結ばれている。リシンは完全分子(A・B両鎖がジスルフィド結合で連結した状態)では、毒性を発現しない。A・B両鎖を結ぶジスルフィド結合は容易に還元され、A・B両鎖が遊離状態となって初めてA鎖の細胞毒性が発現される。A鎖の細胞毒性は真核細胞リボソームの60Sサブユニットを不活性化してポリペプチド鎖延長因子EF-2のリボソームへの結合能を低下させることによってタンパク質合成を阻害する。その分子レベルの機構は、リボソームの28SrRNAのA 4324塩基の脱離反応の触媒(特異的N-glycosidase)活性にある。B鎖には、2箇所糖結合部位(レクチン作用を示す)があり、細胞の凝集作用をもつ。

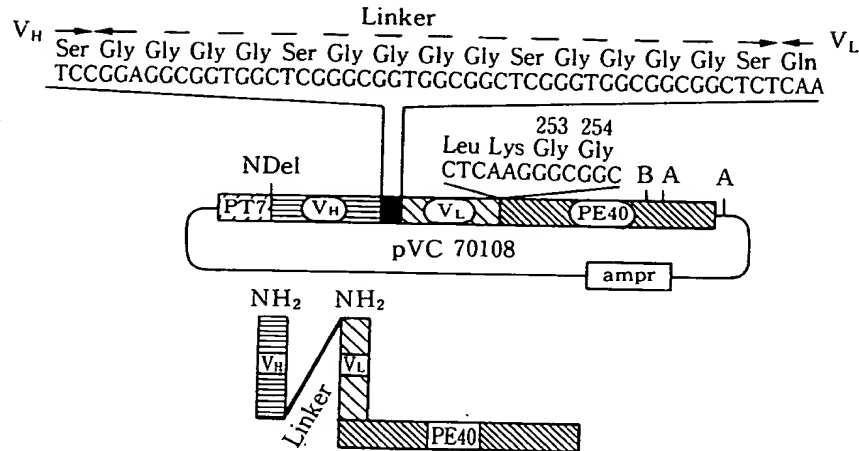
リシン類似の植物毒素に、*Abrus precatorius* (トウアズキ)の種子から得られるアブリン(abrin)があり、構造、作用ともに類似している。その他にも類似の植物毒素が知られている。

6. 5. 3 *Pseudomonas* (緑膿菌) 外毒素 (PE)

緑膿菌外毒素(*Pseudomonas* exotoxin A)は613アミノ酸残基からなる1本鎖ポリペプチド(分子量約66,000)である。PEの細胞毒性作用は、ジフテリア毒素と同様に真核細胞のタンパク質合成阻害であり、その作用機構はジフテリア毒素と同様に、ポリペプチド鎖延長因子EF-2のADPリボシル化によって発現される。X線解析により、三つのドメインに分けられることが解明された。

ドメインI[(Ala 1-Glu 252; ドメインIa)および(Ala 365-Gly 404; ドメインIb)]は、細胞の受容体への結合能、ドメインII(Gly 253-Asn 364)は膜挿入機能、そしてドメインIII(Gly 405-Lys 613)はADPリボシル化触媒活性をもつ。Glu 553が活性に関与し、Aspに置換すると活性は1/100以下

THIS PAGE BLANK (USPTO)



【図6.8】抗Tac (Fv)-PE40発現プラスミド

V. K. Chaudharyら: *Nature*, 339, 394 (1989), Fig. 1

発現プラスミド pVC 70108は抗 Tac (Fv) [V_Hのアミノ末端から116番アミノ酸, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃からなる15アミノ酸残基のペプチド・リンカー, およびV_Lのアミノ末端から106番アミノ酸からなる結合ポリペプチドに, さらにシュードモナス外毒素の253番アミノ酸-613番アミノ酸までを含むポリペプチドを結合した長鎖ポリペプチドを1分子として生産する。

に低下する。C末端5個のアミノ酸(609-613: Arg-Glu-Asp-Leu-Lys)も活性発現に必要といわれる。ドメインIには副作用に関係する領域(246-251: His-Arg-Leu-His-Phe-Pro)が存在する。

V. K. Chaudhary ら⁹⁾は, ドメインIa部分を除いたPE(1-3および253-613のアミノ酸残基; PE40と命名)に対して遺伝子工学的手法を用い, 組換え法による抗体Fv部分と結合したイムノトキシンを調製し, 完全PE同様の細胞毒性を発現することを認めている。Chaudhary らは, 抗体Fv断片に, 毒素を結合した複合体を調製する方法を開発した。抗 Tac (Fv)-PE40,

【表6.3】抗Tac抗体-シュードモナス外毒素複合体の結合方法によるイムノトキシンとしての活性の変化

複合体	調製法	ID ₅₀ (ng/ml)
抗Tac抗体-PE	化学法(チオエーテル結合)	1.2
抗Tac抗体-PE40	化学法(チオエーテル結合)	13
抗Tac(Fv)-PE40	遺伝子工学法	0.15
IL-2-PE40	化学法	1~5

[V.K.Chaudhary, et al.: *Nature*, 339, 394 (1989) よりまとめた。]

(注) 抗Tac(Fv)-PE40(遺伝子工学法調製品)は, 抗Tac抗体-PE40(化学法調製品)に比べて分子量が約30%小さいが, モル・ベースでも抗Tac(Fv)-PE40のほうが強力な活性を保持していることは明らかである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

すなわちヒト・インターロイキン2受容体のp55サブユニットに対する抗体、抗Tac抗体のV領域断片(Fv)と緑膿菌の菌体外毒素(PE)の細胞膜結合領域(ドメインIa)を欠損した断片との複合体を調製した(図6.8).

抗Tac抗体 V_H と V_L とをアミノ酸15量体からなるリンカー・ペプチド[(gly-gly-gly-gly-ser)₃]により結合し、 V_L のC末端にPE40(アミノ酸残基253-613)を直結した形の産物が生成されるようにベクターを構築した. この産物[抗Tac(Fv)-PE40]は、Tac抗原(IL-2の低親和性受容体)を多量に発現しているHUT-102細胞のタンパク質合成を用量依存的に阻害した. 彼らがこれまでに報告してきた化学的結合法によって調製した複合体と比較してみると、表6.3に示すように、より強い活性を示した.

6. 5. 4 一本鎖リボソーム不活性化タンパク質

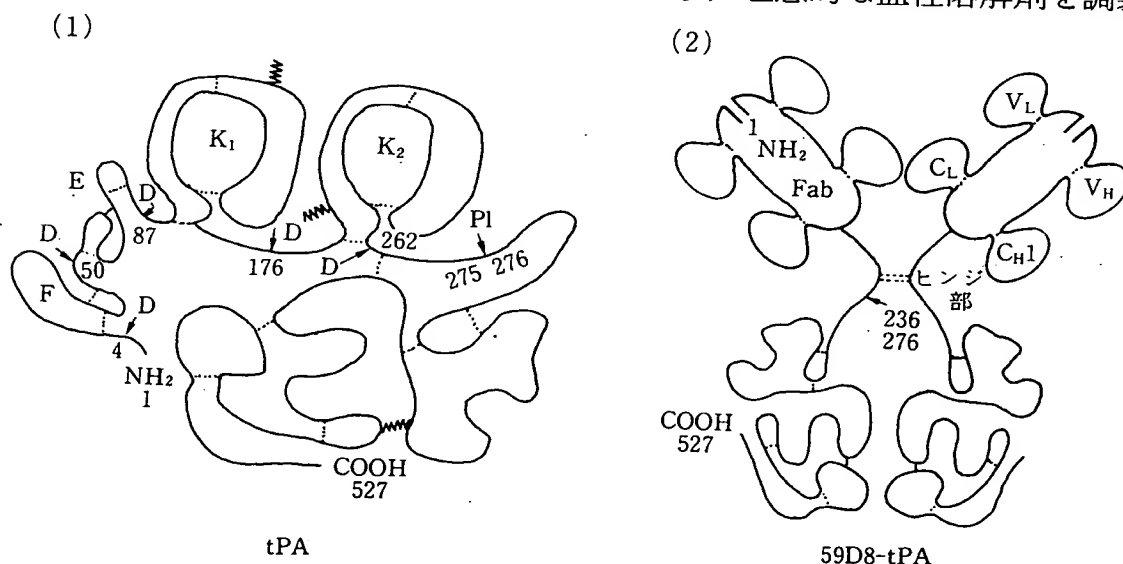
植物由来で、一本鎖ポリペプチド(分子量約30,000, 塩基性pI)からなり、リシンA鎖様の作用をもつ毒素の一群を一本鎖リボソーム不活性化タンパク質(Single Chain Ribosome Inactivating Proteins, SCRIP)という. 無細胞系では強いタンパク質合成阻害作用を示すが、B鎖をもたないので、そのままでは細胞に取り込まれず、毒性を発現しない. イムノトキシンとして、細胞内への侵入を促進すれば、強力な細胞致死作用を発現する. SCRIPは多数知られており、*Gelonium multiflorum*の種子から得られるGelonin, *Saponaria officinalis*由来のSaporin, *Momordica charantia*由来のMomordin, *Bryonia dioica*由来のBryodin, *Phytolacca americana*(ブタクサ)由来のPokeweed antiviral protein(PAP)などがある.

6. 6 標的指向性を高めた血栓溶解剤の調製

前節までに対象とした標的指向性薬剤は、主として抗がん剤であった. これは、薬剤の標的指向性が重要な問題となるのが副作用の点であることから、抗がん剤あるいは免疫系の特殊クローンの除去を目的とするような薬剤の場合にもっとも必要性が高いからである. その他の薬剤においても、標的指向性が高いことは薬剤としての理想である.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

血栓溶解剤として、ウロキナーゼの使用が四半世紀にわたっているが、局所血栓溶解という目的以外に、全身性出血傾向招来という無視できない副作用のため、最近では使用が低下してきている。ウロキナーゼに比べて出血傾向の招来性が低いとして期待されていたTPA (tissue plasminogen activator; 組織プラスミノゲンアクチベーター; tPAとも略称) が、わが国では1991年に発売された。しかし、TPAにも副作用としての出血傾向が皆無ではない。種々のプラスミノゲンアクチベーター (PA) に共通する問題点は、PAが不溶化したフィブリンだけでなく、フィブリン生成の基質となるフィブリノーゲンにまで親和性をもち、低フィブリノーゲンを引き起こすことである。このことから、フィブリンに親和性をもち、フィブリノーゲンには親和性をもたない抗体にTPAあるいはその他のPA、あるいはそのPA触媒活性断片分子を結合した複合ポリペプチドを構築することにより、理想的な血栓溶解剤を調製し



【図6.9】 tPAおよびtPA触媒活性部と抗フィブリン抗体F(ab)₂との複合体模式図

E. Haber, et al., : *Science*, 243, 51 (1989). Fig 1, 2 から.

- (1) tPAの構造 (二次元表現): tPAは、全長527アミノ酸残基からなり、プラスミンによって275-276アミノ酸残基の間で切断される。アミノ末端側をA鎖、カルボキシル末端側をB鎖といい、A鎖にフィブリン親和性、B鎖に触媒活性がある。点線はジスルフィド結合を示している。
- (2) tPA触媒活性部と抗フィブリン抗体F(ab)₂との複合体の構造 (二次元表現). 抗フィブリン抗体59D8のFab領域H鎖の236番グリシン残基とtPAの触媒活性部アミノ末端237番イソロイシン残基とを結合した複合体 (ハイブリッド分子). 複合体は、Fabがジスルフィド結合により連結してF(ab)₂を構成しているため、tPA触媒活性分子も2分子から構成され、[Fab-tPA (B)]₂の形の分子となっている。
- V_H, V_L, C_H, C_Lは抗体のドメインを示している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ようという試みが, E. Haber のグループによって企てられた¹⁰⁾.

たとえば, 抗フィブリン抗体 59D 8 の Fab 領域の H 鎖 236 Gly に TPA の 276 Ile を結合した複合体を調製した(図 6. 9). フィブリンに特異的な抗フィブリン抗体の誘導には, フィブリン β 鎖の N 末端 6 アミノ酸残基からなるペプチド (フィブリノーゲンには存在しておらず, フィブリンに特異的なエピトープ) をハプテンとして用いた. 得られた抗体のフィブリンに対する結合親和性は 0.77 nM で, TPA のフィブリンに対する結合親和性の $0.16 \mu\text{M}$ に比べると, 200 倍以上の高い親和性をもっている. ハイブリド分子の調製には, 当初, ジスルフィド交差結合試薬 SPDP*¹ を使用していたが, 後には, 遺伝子工学的手法により, 図 6. 9 に示したように $(\text{Fab-TPA})_2$ の形の分子を 59D 8 ハイブリド細胞の変異体で生成させた¹¹⁾.

抗体の抗原結合部位断片分子に毒素その他の薬物を結合した複合体の調製は, 今や目新しい展開ではなくなってきており, 一般的な方法として広く応用できる. 抗体-酵素複合体なども特殊の応用ではなく, 手法的には組換え DNA 法によって目的の複合体を調製することが多くなるであろう.

同様のアイディアであるが, 抗体と PA との結合に交差結合剤を用いる場合には, 結合が必ずしも意図したとおりに進まず, 得られた複合体の触媒活性は結合前の PA の触媒活性の 15~25% 程度に低下していることが多い. そこで, T. Kurokawa ら¹²⁾ は, 二重特異性抗体を用いる方法を試みた. すなわち, 抗フィブリン抗体産生ハイブリドーマと抗 TPA 非中和抗体産生ハイブリドーマから, フィブリンおよび TPA の両者に二重特異性をもつハイブリド抗体産生ハイブリド・ハイブリドーマを造成し, 目的抗体を調製した. この二重特異性抗体に TPA を親和結合させたのち, その作用を測定したところ, フィブリンに高い特異性を示すとともに, PA 活性は結合前の TPA とまったく同等であった.

* 1) SPDP: *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate.

参考文献

[A] 一般参考書・総説

- 1) A. E. Frankel(ed.): "Immunotoxins", Kluwer Academic Publi-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- shers (1988).
- 2) J. D. Rodwell (ed.) : "Antibody-mediated Delivery Systems", Marcel Dekker, Inc. (1988).
 - 3) I. Pastan, et al. : 'Immunotoxins. [Review]', *Cell*, 47, 641 (1986).
 - 4) D. C. Blakey, et al. : 'Antibody toxin conjugates : A perspective.', in H. Waldman(ed.) "Monoclonal Antibody Therapy" : Progress in Allergy, Vol. 45, pp. 50~90 (1988).
 - 5) E. Vitetta, et al. : 'Redesigning native poisons to create anti-tumor reagents.', *Science*, 238, 1098 (1987).
 - 6) R. D. May, et al. : 'Intracellular routing rather than cross-linking or rate of internalization determines the potency of immunotoxins directed against different epitopes of sIgD on murine B cells.', *Cellular Immunology*, 135, 490 (1991).
 - 7) J. M. Shaw, et al. : 'Drug delivery particles and monoclonal antibodies.' in edited by N. R. Rose "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications." p.285. Marcel Dekker, Inc. (1987).
 - 8) I. Pastan and D. FitzGerald : 'Recombinant toxins for cancer treatment.', *Science*, 254, 1173 (1991).
 - 9) 原健, 加藤嘉規 : 「癌ターゲティング療法として用いる抗体-細胞毒複合体」 有機合成化学協会誌, 46, 1106 (1988).
 - 10) 船津軍喜 : 「ヒマ種子毒蛋白質リシンの毒性発現機構」 化学と生物, 26, 13 (1989).
 - 11) 近藤寿彦 : 「緑膿菌毒素の蛋白質工学と癌のターゲティング療法——イムノトキシンを利用した癌ミサイル療法の可能性と問題点——」 蛋白質核酸酵素34, 1793 (1989).
 - 12) 岡達三 : 学会見聞記「第2回イムノトキシン国際シンポジウム」 蛋白質核酸酵素35, 2852 (1990).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[B] 引用文献

- 1) R. A. Miller, et al. : *New Eng. J. Med.* , **306**, 517 (1982).
- 2) G. Mathe, et al. : *Compt. Rend. Acad. Sci.* , **246**, 1626 (1958).
- 3) T. Ghose and S. P. Nigama : *Cancer*, **29**, 1393 (1972).
- 4) O. W. Press, et al. : *J. Immunol.* , **141**, 4410 (1988).
- 5) R. D. May, et al. : *Cell. Immunol.* , **135**, 490 (1991).
- 6) F. Moolten and S. Cooperband : *Science*, **169**, 68 (1970).
- 7) B. G. VanNess, et al. : *J. Biol. Chem.* , **255**, 10710 (1980).
- 8) D. P. Williams, et al. : *Zbl. Bakt. Suppl.* , **19**, 123 (1990).
- 9) V. K. Chaudhary, et al. : *Nature*, **339**, 394 (1989).
- 10) C. Bode, et al. : *Science*, **229**, 765 (1985).
E. Haber, et al. : *Science*, **243**, 51 (1989).
- 11) J. M. Schnee, et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6904 (1987) .
M. S. Runge, et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10337 (1991).
- 12) T. Kurokawa, et al. : *Bio/Technology*, **7**, 1163 (1989).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99P133WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/03054	International filing date (<i>day/month/year</i>) 07 June 1999 (07.06.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 08 June 1998 (08.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, 15/62, 15/63, 5/20, C07K 16/30, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577, A61K 39/395		
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of <u>19</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 August 1999 (06.08.99)	Date of completion of this report 22 May 2000 (22.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-3,5-6,9-13,16-18,21-24,27-31,33-46, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 4,7-8,14-15,19-20,25,25/1,26,32,47-50, filed with the letter of 21 January 2000 (21.01.2000)
- ☒ the claims:
 pages 1-39, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-9,14, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 10-13, filed with the letter of 21 January 2000 (21.01.2000)
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages 1-26, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 29-31,39

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 29-31,39 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of Claims 29-31 and 39 essentially relates to a method for diagnosis of the human body, which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 29-31,39

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-28,32-38	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	7-10,16-19,27-28,32-38	YES
	Claims	1-6,11-15,20-26	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28,32-38	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-6, 11-15, and 20-26

Document 1 [J. Exp. Med. Vol. 168, No. 5, 1988, pages 1523 to 1530] describes a base sequence of cDNA that codes for human LAR (leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase) and its estimated amino acid sequence. In this amino acid sequence, a transmembrane region is described, and the intracellular domain (phosphatase domain) and extracellular domain are clearly delineated.

Document 2 [EMBO J. Vol. 11, No. 3, 1992, pages 897 to 907] describes the characterization of a monoclonal antibody having LAR reactivity by expression of a fused protein of LAR-LCA (lymphocyte common antigen) and it also describes the discovery of the location necessary to separate the extracellular domain (E subunit) from the intracellular domain (P subunit) by the deletion of a portion of the cDNA sequence that codes for LAR.

Document 3 [Tissue Antigens, Vol. 42, No. 4, 1993, page 441] describes the preparation of a monoclonal antibody AE-6 as an immunogen to the CD45 (LCA) phosphatase domain (intracellular domain) VHCSAGV, and states that this antibody reacts with the CD45 isoform p180, enabling identification of fine differences in the cytoplasmic domain.

In summary, document 3 discloses the immunogenicity of the LCA phosphatase domain, and because it can be predicted that the phosphatase domain of LAR, which is a molecule resembling LCA, will also have immunogenicity, the expression of all or part of the LAR phosphatase domain described in document 1 based on the method described in document 2 and the preparation of a monoclonal antibody having specificity toward the phosphatase domain of LAR using the polypeptide thus obtained as the primary immunogen based on the preparation process of the antibody described in document 3 can easily be performed by persons skilled in the art. Moreover, utilizing the monoclonal antibody thus obtained to quantitate and isolate the LAR molecule can easily be conceived of by persons skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Trowbridge, I. S. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1095**, 46-56, 1991). PTPs can be classified generally to: (1) membrane type PTPs having transmembrane region (LAR, leukocyte common antigen, namely CD45, LAR and PTP α , β , γ , δ , ϵ and ζ), and cytoplasm type PTPs without transmembrane region (PTP1B, TC-PTP, PTP-MEG, PTPH1, STEP and PTP1C).

Many of membrane type PTPs have two PTP homologous domains inside the cell (domain 1 and domain-2, see, Fig. 1(a) and (b)). A sequence comprising cysteine (signature motif), Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-Gly (SEQ ID NO: 2), has been conserved in the phosphatase domains between the PTPs reported heretofore. The research on crystallography of PTP1B revealed that the region forms small pockets on the surface of a PTP molecule, and that the cysteine residue is located to the bottom of the pocket, participating directly in binding of the molecule to phosphate (Barford, D. *et al.*, *Science*, **263**, 1397-1404, 1994). In addition, it was also revealed that the depth of the pocket of PTP may determine the specificity of serine/threonine phosphatase because phosphate that is binding to serine or threonine cannot reach to the pocket of the enzymatic active center of PTP1B. Moreover, the importance of the above-mentioned signature motif in exhibiting the enzymatic activity has been elucidated (Streuli, M. *et al.*, *EMBO J.*, **9**, 2399-2407, 1990). Taking into account of these observations, it has been conceived that the conserved cysteine in domain 1 may play an important role in exhibiting the enzymatic activity, and domain 2 may determine the substrate specificity of the enzyme.

Among a group of PTPs, LAR derived from human is a prototype of receptor type protein tyrosine phosphatases, which was cloned from human placental genome library using a phosphatase domain of CD45, a receptor type protein tyrosine phosphatase, as a probe (Streuli M. *et al.*, *J. Exp. Med.*, **168**, 1553-1562, 1988). CD45 is specifically expressed on hemocytic cells, whilst LAR is expressed on the cells other than hemocytic cells, particularly in insulin sensitive organs such as liver and skeletal muscle (Goldstein B.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

domain but not to CD45.

Nodular goiter includes thyroid tumor and adenomatoid goiter that is hyperplastic.

Although adenomatoid goiter is multiple nodular, the part thereof is often accompanied by carcinoma. On diagnosis of nodular goiter, to avoid overlooking the carcinoma is important. At present, palpation, ultrasonic diagnosis, fine needle aspiration, and histological diagnosis of tissue sections are predominantly carried out in order to clinically diagnose thyroid cancer. Goiter can be classified to benign node, papillary carcinoma, follicular carcinoma, anaplastic carcinoma, medullary carcinoma and malignant lymphoma, whilst thyroid cancer can be generally classified to well differentiated type thyroid carcinoma (papillary carcinoma and follicular carcinoma) and undifferentiated type thyroid carcinoma. Almost of the goiter is benign node that is fairly common, however, it is indeed difficult to definitely diagnose a minor malignant lesion from among far more benign nodes. Differentiated type thyroid carcinoma is excised when a susceptible portion is found during operation, then the excised specimen is observed microscopically, thereafter whole thyroid is excised if it was determined to be carcinoma. In addition, even if a blood test and diagnostic imaging are initially performed, accurate diagnosis may be impossible, thus it is apt to be finally obliged to anyhow carry out the excision of the tissue. Although fine needle aspiration may be conducted, definite diagnosis is less possible compared to morphologic observation using sections of the tissue, because cell-cell linkages may be broken in the specimens by puncture-and-suction. Furthermore, iodine scintillation and technetium scintillation may be performed, however, they cannot nevertheless result in an affirmative basis of diagnosis.

Carcinoma cells incorporate less iodine compared to normal thyroid cells. Many of benign nodes incorporate radiolabelled iodine, however, there exist many

THIS PAGE BLANK (USPTO)

benign nodes that do not incorporate radiolabelled iodine thus indicating 'cold'. Further, the nodes may be cancerous even though they indicate 'hot'. Accordingly, final diagnosis is entrusted to the morphologic observation using the tissue sections, however in accordance with this manner, there can be the cases in which the tissue is excised when suspected even if the part thereof may appear to be normal, therefore, possibilities are increased wherein recurrent nerve that operates vocal chords is injured on the excision of thyroid. Therefore, there exist strong desires of clinicians or pathologists for the definite diagnostic methods, which can distinguish between normal cells and malignant cells prior to excision of the tissue.

SUMMARY OF THE INVENTION

One aspect of the present invention is to provide an antibody that specifically binds to a phosphatase subunit of LAR, particularly an antibody that specifically binds to an intracellular domain of LAR. Further, in accordance with the present invention, an antibody is provided that specifically binds to an intracellular domain of a LAR phosphatase subunit, without specificity to other protein phosphatases.

The antibody may be preferably generated using a polypeptide corresponding to an intracellular domain of LAR, encoded by a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or any of fragments thereof as an antigen. Further, preferred antibody may be a monoclonal antibody because of its immunospecific property.

Such an antibody may be generated using a fusion protein comprising a LAR phosphatase domain and another protein or a polypeptide fragment, as an antigen. As the another protein or a polypeptide fragment to be a member of the fusion protein, GST (glutathione-S-transferase) may be particularly suitable, besides, polyhistidine (preferably 6 histidine residues), calmodulin binding peptide (CBP), protein A may be employed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In yet another aspect of the present invention, a method for producing LAR and/or LAR derived molecules is provided, comprising the step of: isolating LAR and/or LAR derived molecules using the antibody set forth above. Isolation of the targeted molecules in the method for production may be suitably carried out by affinity and/or immunoprecipitation by using a support that was previously bound with the antibody, as in the aforementioned method of quantitative determination of LAR and/or LAR derived molecules.

Further aspect contemplated by the present invention is to provide a method for identifying the presence of LAR and/or LAR derived molecules within tissue comprising the step of: performing immunohistological examination using the aforementioned antibody. As the immunohistological examination, for example, *in situ* immunohistological staining with a labelled antibody may be adopted, thus LAR protein and/or a fragment or a polypeptide that comprises at least a LAR intracellular domain, can be detected.

The present invention is further directed to a specific anti-LAR antibody to thyroid carcinoma cells. The antibodies may be those elicited using a LAR molecule as well as the fragment thereof, e.g., a phosphatase domain, an extracellular domain or the like as an antigen, and may include monoclonal and polyclonal antibodies, peptide antibodies, single chain antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, CDR-grafted antibodies and the like. Particularly, the aforementioned antibodies to a LAR phosphatase subunit, those having immunoreactivity with thyroid carcinoma cells are provided by the present invention. Herein, "having immunoreactivity with thyroid carcinoma cells" means that almost no immunoreactivity with normal thyroid cells or benign tumor thyroid cells (less than or equal to 10% of the normal cells) is exhibited, whilst higher immunoreactivity to the thyroid cells that became cancerous (more than or equal to 20% of the carcinoma cells) is exhibited.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Accordingly, it makes possible to diagnose thyroid cancer through utilizing such an antibody, thus a method for histological diagnosis of thyroid carcinoma is also contemplated by the present invention. The diagnostic method is characterized by comprising the steps of: taking a thyroid tissue specimen from a subject suspected as suffering from thyroid cancer, and conducting diagnosis of thyroid cancer through evaluating immunoreactivity between the antibody set forth above and the tissue specimen. In this instance, the thyroid tissue specimens may be any of the specimens such as those taken by fine needle aspiration from a subject, or those prepared by excision and extirpation of a part of the thyroid. The diagnostic method where the specimens taken by fine needle aspiration are employed is more preferable in respect of lower invasiveness to the subject. This is an important advantage provided by the present invention taking into account of the nature of the conventional diagnostic method of thyroid cancer based on the histological observation of the tissue, which requires sampling of the tissue specimens in their intact states for evaluation, thus highly invasive incision procedure has been obliged to practice. Additionally, also in the immunohistochemical diagnostic method utilizing the tissue section, the present invention is more useful because more prominent reliability can be achieved than in the conventional method.

In the above-described diagnostic method, the specimens taken by fine needle aspiration may be evaluated for their immunoreactivity by common *in vitro* immunoassays e.g., immunoblotting, immunoprecipitation, ELISA or the like, using the antibody of the present invention. In contrast, when tissue sections are used as specimens, conventional immunohistochemical staining techniques can be utilized to determine the immunoreactivity based on immune responses.

Moreover, the present invention provides a composition for histological diagnosis of thyroid carcinoma comprising the aforementioned antibody. Markedly reliable diagnostic method of thyroid cancer as set forth above can be performed using

THIS PAGE BLANK (USPTO)

fluorescein-di-(β -D-galactopyranoside), 4-methyl-umbelliferyl-D-galactopyranoside, or the like.

The present invention further contemplates a kit, which comprises the above-described monoclonal antibody or polyclonal antibody, and reagents.

As a crosslinking agent, N,N'-orthophenylenedimaleimide, 4-(N-maleimidemethyl) cyclohexanoyl N-succinimide ester, 6-maleimidehexanoyl N-succinimide ester, 4,4'-dithiopyridine, orthophenylenedimaleimide, 4-(N-maleimidemethyl) cyclohexanoyl N-succinimide ester, 6-maleimidehexanoyl N-succinimide ester, 4,4'-dithiopyridine, or other known crosslinking agents can be utilized. The reaction of such a crosslinking agent with the enzyme and the antibody may be proceeded in accordance with known methods depending upon the properties of the crosslinking agent that was employed.

Additionally, the antibodies to be used may be any fragments of these antibodies for example, Fab', Fab, F(ab')₂ depending on conditions. Furthermore, an enzymatically labelled antibody can be obtained by a similar process in either case of polyclonal antibody or monoclonal antibody, whichever. When the enzymatically labelled antibody that was obtained by using the aforementioned crosslinking agent is purified by any known methods, more sensitive immunological determination system can be achieved. The enzymatically labelled antibody that was purified in such a manner may be mixed with a stabilizer such as thimerosal, glycerol or the like, alternatively, may be lyophilized, and then stored in a cold and dark place.

The present invention further provides a DDS (Drug Delivery System) formulation that was targeted to thyroid carcinoma cells using the above-described antibody having specific immunoreactivity to thyroid carcinoma cells.

It have been elucidated that several genes are involved in thyroid carcinoma. Mutations in tyrosine kinase domain of RET or TRK gene were found in some of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

patients suffering from papillary carcinoma (Fusco, A. *et al.*, *Nature*, **328**, 170-2, 1987). Moreover, mutation in RET gene was observed in 3-30% of the papillary carcinoma patients without any history of a radiation exposure in the past (Santoro, M. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **89**, 1517-22, 1992; Bongdrzone, I. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 2006-9, 1996; Zou, M. *et al.*, *Cancer*, **73**, 176-80, 1994), whilst higher incidence of 60-80% of the RET mutation was observed in papillary carcinoma diagnosed, for children with experiences of radiation exposure on the disaster at Chernobyl nuclear power plant, or the patients who have case histories of radiation exposure in their childhood (Fugazzola, L. *et al.*, *Cancer Res.*, **55**, 5617-20, 1995; Klugbauer, S. *et al.*, *Oncogene*, **11**, 2459-67, 1995; Nikiforov, Y. E. *et al.*, *Cancer Res.*, **57**, 1690-4, 1997; Bounacer, A. *et al.*, *Oncogene*, **15**, 1263-73, 1997), and frequency of TRK gene mutation is significantly low (Bongdrzone, I. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 2006-9, 1996). Point mutation of RAS gene is frequently observed in goiter and thyroid follicular carcinoma. The basis of this fact is conceived as RAS gene point mutation in an early stage of tumor development (Fagin, J. A., *Molecular pathogenesis*. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's, the thyroid: a fundamental and clinical text*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 909-16, 1996; Challeton, C. *et al.*, *Oncogene*, **11**, 601-3, 1995). The mutation of genes encoding TSH and stimulatory G protein is reported in some cases of thyroid follicular carcinoma (Challeton, C. *et al.*, *Oncogene*, **11**, 601-3, 1995; Russo, D. *et al.*, *Oncogene*, **11**, 1907- 11, 1995). Further, it was also reported that inactive point mutation of tumor suppressor gene p53 is rare in differentiated thyroid carcinoma, however, it is frequently found in undifferentiated carcinoma (Fagin, J. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **91**, 179-84, 1993; Ito, T. *et al.*, *Cancer Res.*, **52**, 1369-71, 1992).

According to such known information, a nucleic with the object of therapy or diagnosis of thyroid cancer can be included in a DDS formulation targeted by an antibody to LAR.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Furthermore, it is also known that proliferation of thyroid tumor cells is regulated by thyroid stimulating hormone (TSH), and that suppression of TSH secretion by administering a thyroid hormone drug may improve recurrence, survival rate or the like of thyroid tumor. Accordingly, a protein, a nucleic acid or a compound that may inhibit TSH stimulation can be also included in the DDS formulation.

On the other hand, the present DDS formulation, which is characterized by targeting to thyroid carcinoma cells using the aforementioned antibody having specific immunoreactivity with thyroid carcinoma cells, may comprise one or more materials which are selected from a group consisting of a nucleic acid, iodine, radioactive iodine, technetium and a protein, accordingly, through including such materials to the formulation, higher targeting ability to thyroid cancerous cells is allowed, which can be utilized for therapy or diagnosis of thyroid cancer.

“Nucleic acid” herein refers to for example, a nucleic acid encoding a protein that can be expressed in a host cell, an antisense nucleic acid derived from cells, a nucleic acid of a decoy having a sequence of a gene encoding a binding protein of a cell-derived transcription factor or a sequence of a binding site of a transcription factor, or a similar sequence thereto.

“Antisense nucleic acid” represents a nucleic acid or a nucleic acid sequence that binds specifically to a nucleic acid being able to be expressed in future, at any stage of the gene expression, i.e., replication, transcription, translation or the like, thus inhibits expression of the nucleic acid which can be otherwise expressed in future. Antisense nucleic acid also includes an anti-gene nucleic acid resulting from a triple strand. A nucleic acid encoding a decoy represents a nucleic acid having a sequence of a nucleic acid encoding a binding protein of a cell-derived transcription factor or a sequence of a binding site of a transcription factor, or a similar sequence thereto, thus through introducing the nucleic acid into a cell as a decoy, binding of a transcription factor to its binding site can be

THIS PAGE BLANK (USPTO)

thus it is markedly useful for administration to a human body.

In addition, usefulness may be enhanced as a diagnostic/therapeutic drug, through radiolabelling such an antibody with iodine, or including radiolabelled iodine into a pharmaceutical composition that was targeted with the antibody.

When papillary carcinoma or follicular carcinoma invades into surrounding tissue or metastasizes to a distal portion (especially to lung and bone) through blood circulation, a common therapeutic strategy for destroying the tumor has been administration of radiolabelled (^{131}I -I) iodine. Normal thyroid cells incorporate iodine from the blood and concentrate it. This process is stimulated by TSH (Thyroid Stimulating Hormone) that is secreted from pituitary gland. Iodine is thereafter used to produce thyroid hormone (thyroxine T₄). As set forth above, thyroid carcinoma or metastatic carcinoma normally incorporates only slight amount of iodine (or radioactive iodine). However, when carcinoma is under influences of abundant TSH, a part of thyroid carcinoma or metastatic one becomes liable to incorporate a significant amount of iodine upon stimulation. Consequently, a large amount of radiation is allowed to be directly exposed to carcinoma without injuring the surrounding tissue. When intact thyroid is present in a body with producing a normal level of thyroid hormone, TSH level that is produced may remain relatively low, however, upon decrease of thyroid hormone level due to removal of whole thyroid or its destruction, pituitary gland rapidly accelerates TSH secretion. The TSH stimulates thyroid carcinoma, leading to incorporation of radioactive iodine. When radioactive iodine therapy is performed for metastatic thyroid carcinoma, whole thyroid must be removed almost completely by an operation, and the residual tissue is required to be destroyed using radioactive iodine. Once this procedure is carried out, patients having tumors remained in the neck or those having metastatic carcinoma to a distal place are subjected to scanning when their TSH level is high enough, using a test amount of radioactive iodine (normally 2-10 mCi). If substantial amount of radioactive iodine was

3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

proved to assemble to a region of thyroid carcinoma, yet more therapeutic amount of radioactive iodine (normally 100-200 mCi: 3700-7400 MBq) is administered in an attempt of destruction of the tumor. Because radioactive iodine is safe and effective also to the patients having more invasive thyroid carcinoma, many physicians have learned to use radioactive iodine routinely for less invasive papillary carcinoma or follicular carcinoma.

Therefore, by labelling the antibody that binds to LAR using iodine, or by including radioactive iodine into a pharmaceutical composition targeted with the antibody, specificity to thyroid carcinoma cells can be further enhanced, thus therapeutic or diagnostic utilization may be enabled.

Accordingly, an anti-LAR antibody that specifically recognizes thyroid carcinoma cells is also useful in a Drug Delivery System (DDS). Drug Delivery System (Mitsuru Hashida, *Drug Delivery System*, New Challenges to Manufacturing Drugs and Therapy, Kagaku Doujin, (1995)) is a novel technique related to drug administration aiming at: contriving administration routes or forms of drugs; delivering the drugs selectively to targeted sites by controlling pharmacokinetics of the drugs in a body; achieving the optimal therapeutic effects as a result; and minimizing the adverse effects exerted by the drugs. Although various DDS formulations have been developed heretofore, liposome formulations (Hiroshi Terada, Tetsuro Yoshimura *eds.*, *Experiment Manual of Liposome in Life Science*, Springer-Verlag, Tokyo, (1992)) are among all highlighted in supplementation of a deficient enzyme, administration of carcinostatic agent and antibiotics, as well as in gene therapy.

Liposome is a closed small vesicle composed of a lipid bilayer of which basis is phospholipid that constructs a biomembrane, which is known to be safe with a superior function as a drug carrier, because it can capsule various drugs irrespective of their solubility whether the drugs may be lipid soluble or water soluble, according to their composition comprising a lipid membrane and an aqueous layered part.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

with LAR/CS and wild type insulin receptor.

Figure 3 represents immunoblots illustrating phosphorylation-dephosphorylation in COS cells that were cotransfected with wild type or mutants of LAR, and wild type insulin receptor.

Figure 4 represents an immunoblot illustrating dephosphorylation of a β -chain of insulin receptor by wild type or mutants of LAR.

Figure 5 represents an immunoblot illustrating tyrosine phosphorylation of insulin receptor and LAR in COS cells that were cotransfected with wild type or mutant of insulin receptor, and LAR/CS.

Figure 6 represents SDS-polyacrylamide gel, showing a molecular weight of the antibody YU1 of the present invention.

Figure 7 represents immunoblots showing immunospecificity of the antibody YU1 of the present invention.

Figure 8 represents immunoblots showing tyrosine phosphorylation of LAR by tyrosine kinase of insulin receptor.

Figure 9 is a schematic drawing depicting a signal transduction cascade of insulin that is controlled by phosphorylation-dephosphorylation in which insulin receptor and LAR participate.

Figure 10 represents results of immunoblotting demonstrating tissue distribution of LAR in mouse using the antibody YU1 of the present invention.

Figures 11-13 represent results of selective staining of cancerous cells in immunostaining of human thyroid carcinoma tissue sections using the antibody YU1 of the present invention.

Figure 14 represents immunoblots of thyroid normal and carcinoma tissues with the antibody YU1 of the present invention, demonstrating the specific immunoreactivity with human thyroid carcinoma tissue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7.6) containing 0.15M NaCl, then 0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride) solution in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.02% hydrogen peroxide and 0.15M NaCl was added, followed by confirmation of color development under microscopy, and then the reaction was terminated by immersion of the slide glass into water.

Following termination of the reaction, the specimen was soaked in Mayer's hematoxylin for 5-10 seconds for counter staining. Thereafter, followed by washes of the specimen with water, and soaking in 100% ethanol for 1 minute twice, next in 100% xylene for 1 minute twice, inclusion with Malinol and observation were carried out.

In these experiments, blocking, secondary antibody, and streptavidin-peroxidase solutions were from LSAB kit available from DAKO Japan Co. Ltd., (Kyoto), and DAB was a commercially available reagent from Dojindo (Kumamoto), Malinol was from Muto Pure Chemicals Ltd., (Tokyo), and Mayer's hematoxylin employed was prepared by the present inventor.

Thus resulted immunohistochemical staining of thyroid carcinoma cells are shown in Figures 11-13. These Figures demonstrate selective reactivity of YU1 antibody to cancerous thyroid tissue cells (brown color stained part), without any reactivity to normal follicular cells and stroma of tumor tissue (blue color stained part).

Accordingly, it was proved that diagnosis of thyroid carcinoma using immunohistochemical staining with the present antibody can be accomplished, and that the present antibody can also be useful in a DDS system comprising anticancer agents (chemotherapeutic agents).

Example 6: Immunohistochemical staining of another benign tumor cells and carcinoma cells

According to the similar procedure in Example 5, immunostaining of various

THIS PAGE BLANK (USPTO)

benign tumor and cancerous tissue cells (that were derived from human) shown in Table 1 below was examined.

Positive results were estimated as appearances of staining based on reactivity to YU1 antibody, and each positivity is presented in Table 1 below.

Table 1

Tumor		Number Of Cases	Number of Positive Cases	Positivity
Benign	Meningioma	10	0	0
	Glioma	13	1	7.7
	Thyroid adenoma	10	0	0
Malignant	Thyroid carcinoma	21	21	100
	Gastric carcinoma	16	1	6.3
	Colon carcinoma	26	13	50
	Lung carcinoma	20	2	10
	Breast carcinoma	20	3	15
	Liver carcinoma	8	0	0
	Kidney carcinoma	21	0	0
	Prostate carcinoma	32	2	6.3

Consequently, it was obviously shown that the positivity in thyroid carcinoma was 100%, to the contrary, benign tumor and carcinoma originated from another organs showed lower positivity or completely negative. Although comparative higher positivity was shown in colon cancer, positive staining presented in colon

THIS PAGE BLANK (USPTO)

carcinoma was considerably distinct from that in thyroid carcinoma, accordingly, specific immunoreactivity of YU1 to thyroid carcinoma cells was suggested, with which remarkable staining were observed.

Example 7: Specific immunoreaction of thyroid carcinoma with YU1:

Studies on feasibility of utilizing immunoassays

To one gram of human thyroid carcinoma and normal tissues that were used in Example 5, 3 ml of cold cell lysis buffer (set forth above in Example 5) was added, and homogenized using Polytron, thereafter, the homogenate was incubated for 30 minutes on ice. Following centrifuge at 4°C, 15,000 x g for 20 minutes, the supernatant was recovered, and additionally obtained supernatant by the same centrifuge condition was recovered, then total supernatant was employed as a tissue sample. Protein determination was performed according to a manual of DC Protein Assay (Bio-Rad).

Thus obtained supernatant (corresponding to 1 mg of protein), or immunoprecipitates of COS-7 cells transfected with LAR using the anti-LAR antibody as a positive control (prepared according to the procedures in Example 1A-C) were electrophoresed, followed by immunoblotting with YU1, according to a procedure described in Experimental Example 1, section E. For detection, Immuno Star Reagents (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was employed.

The results obtained in these experiments are shown in Fig. 14. As is clear from Fig. 14, it was evident that YU1 specifically recognizes the cancerous thyroid tissue, distinct from the normal thyroid tissue. Accordingly, it was proved that tissue samples obtained in aspiration biopsy of thyroid could be utilized for diagnosis of thyroid cancer.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The antibodies to a LAR phosphatase subunit that is provided by the present invention can specifically recognize an intracellular domain of LAR having phosphatase activity. Therefore, the antibodies can be extremely useful tools for elucidating signal transduction mechanisms of insulin, and for identifying, obtaining LAR modulators, binding proteins, and the like. Furthermore, the antibodies can be applied for developing useful diagnostic methods of insulin resistance and NIDDM, for prophylaxis and diagnosis of various disease states of syndrome X that is based on insulin resistance, and for prophylaxis and diagnosis of onset of arteriosclerosis and cardiac diseases.

Additionally, because the antibodies of the present invention have specific immunoreactivity to thyroid carcinoma, they are useful in diagnosis of thyroid carcinoma using aspiration cytology and biopsy, and in pharmaceutical compositions that utilize DDS for thyroid carcinoma therapy, while they can be helpful to molecular biological studies on transcription of LAR molecules in thyroid carcinoma cells and regulation factors of expression at a translational level.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

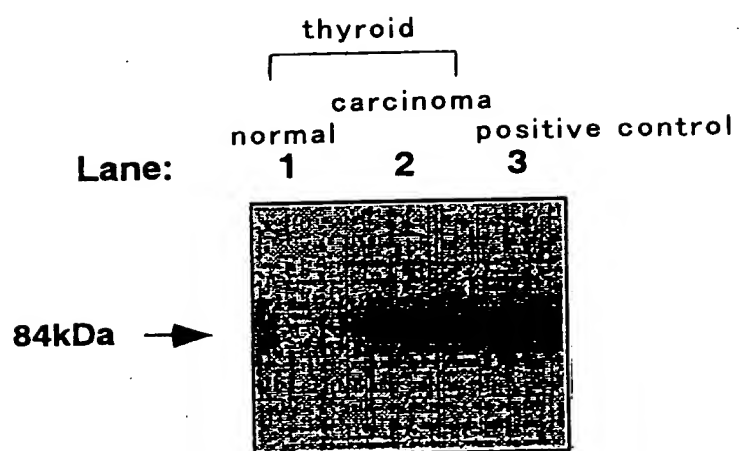
10
/ 14

Fig. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11
/ 14



Fig. 11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12
/ 14

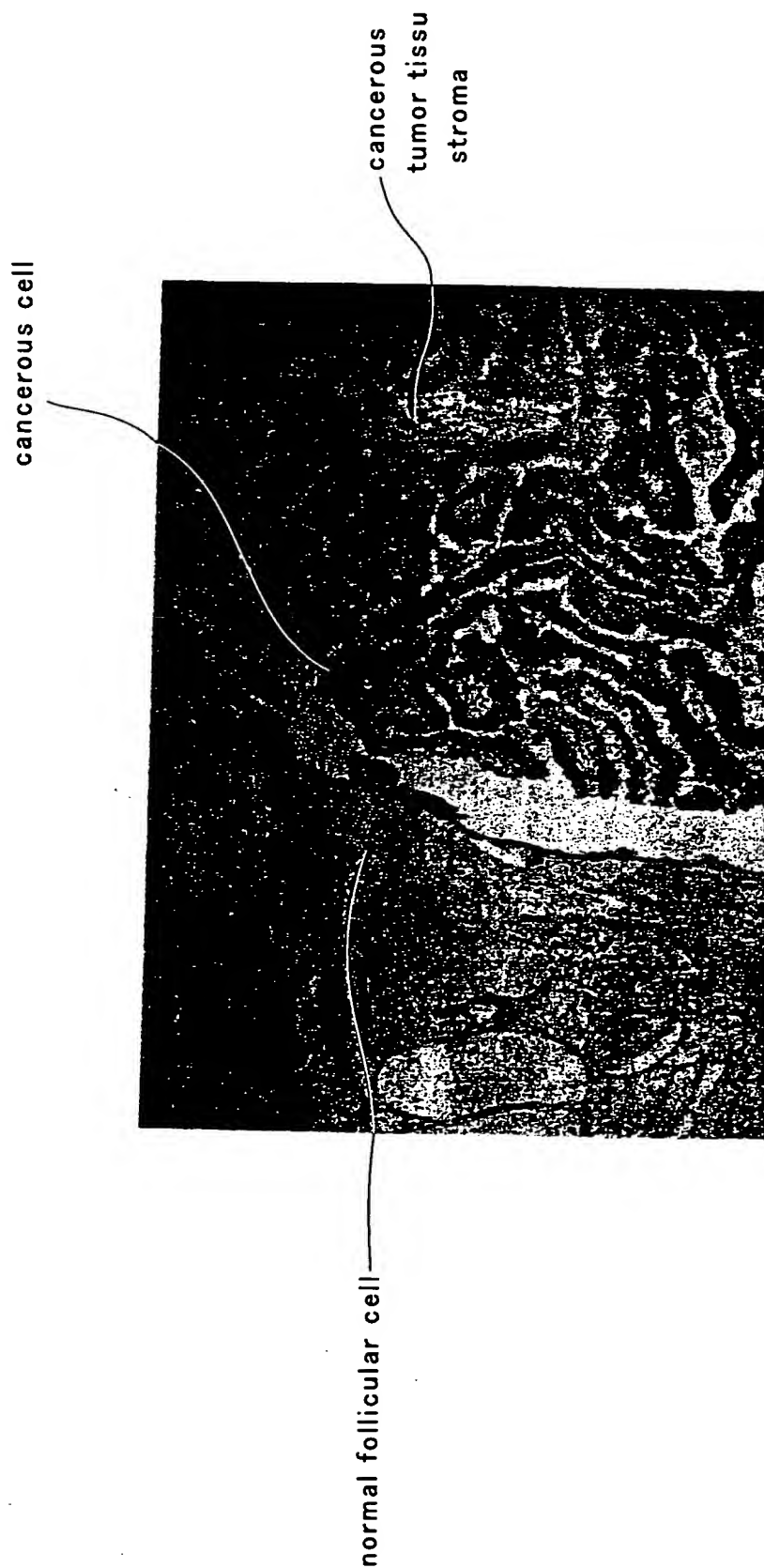


Fig.12

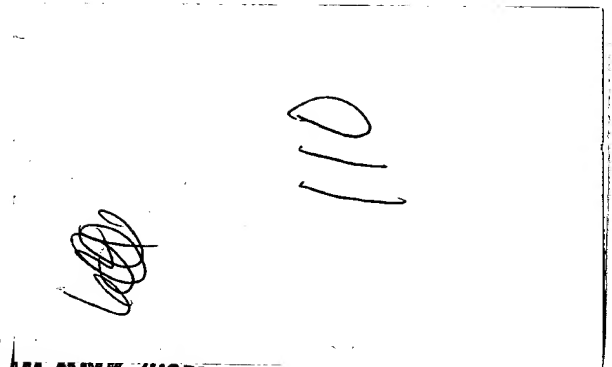
THIS PAGE BLANK (USPTO)



Fig.13

57501750

Rec'd PCT/PTO 08 DEC 2000



THIS PAGE BLANK (USPTO)

明 細 書

LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体

5

〔技術分野〕

本発明は、LAR（白血球共通抗原類似分子）においてホスファターゼ活性を担うP-サブユニット（ホスファターゼサブユニット）に対して特異性を有する抗体、特にLARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体およびその調製方法に関し、さらに詳細には、プロテインチロシンホスファターゼの解析および定量、LAR関連分子の同定および取得、ならびにインスリン抵抗性に関わる症状の治療、予防、緩和等のための処置や診断に適用可能な医薬の開発などに有用な抗体に関する。また本発明は、甲状腺癌の診断、治療等に有用な抗体に関する。

1 0

1 5 〔背景技術〕

近年、動脈硬化発症メカニズムが徐々に明らかにされ、その危険因子が同定されつつある。特に高コレステロール血症、高血圧症、糖尿病および喫煙が動脈硬化の4大危険因子と認定され、その治療が積極的に行われている。これらの病態として臨床的に共通しているのが、インスリン抵抗性である。インスリン抵抗性とは細胞におけるインスリン感受性の低下とほぼ同義語であり、細胞での糖の取り込みにおけるインスリン作用が低下していることを指す。その原因としてはインスリン分泌自体の異常、標的細胞におけるインスリン受容体の異常、細胞内情報伝達系の異常および血行力学的に末梢循環障害に基づく糖の組織への供給減等がある。Reavenは1988年、このインスリン抵抗性を基盤として多くの病態が引き起こされることを報告し、また、インスリン抵抗性、耐糖能異

2 0

2 5

常、高インスリン血症、高トリグリセライド血症、低 HDL コレステロール血症、高血圧をマルチプルに持つ病態をシンドローム X と名付け、動脈硬化発症に深く関わっていることを提唱した (Reaven, G. M. *et al.* ; *Diabetes*, 37, 1595-1607, 1988)。

- 5 また、一般的にインスリン抵抗性により細胞への糖の供給は低下し、
 膵臓におけるインスリン分泌を亢進させ、高インスリン血症を引き起こすことが知られており、臨床の場合においてもインスリン抵抗性の問題が種々浮上している。例えば、インスリン抵抗性・高インスリン血症が糖尿病性腎症を促進し (Niskanen, L. *et al.* ; *Diabetes*, 41, 736-741, 1993)、糖尿病性網膜症の頻度が高くなる (Yip, J. *et al.* ; *Lancet*, 341, 369-370, 1993) という報告がある。さらに、インスリン抵抗性によってプラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1 (PAI-1) の活性が上昇し、血液線溶系機能を低下させたり (Potter van Loon BJ *et al.* ; *Metab. Clin. Exp.*, 42, 945-954, 1993)、粥状動脈硬化の引き金になる (Sato, Y. *et al.* ; *Diabetes*, 38, 91-96, 1989) という文献等も報告されている。

糖尿病は有病率が全人口の 5% を占め、日本人の約 600 万人が罹患している。糖尿病にはインスリン依存性糖尿病 (IDDM) とインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) がある。IDDM は糖尿病全体に対して約 7%、NIDDM は約 90% といわれ、特に、糖尿病の大多数を占める NIDDM の発症は、インスリン抵抗性が重要な成因と考えられている。

- 2 0 現在までに、インスリンのシグナル伝達には細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が重要な役割を演じていることが明らかとされている。インスリンレセプターは分子量約 135 kDa の α サブユニットと 95 kDa の β サブユニットの 2 つの糖タンパクサブユニットがジスルフィド結合によりヘテロテトラマーを形成し、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造をとる。 α サブユニットはインス

- リン結合活性を有し、 β サブユニットは自己リン酸化により活性化する
 プロテインチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase : PTK) ドメイ
 ンを有する。すなわち、インスリンがインスリンレセプターの α 鎖に結
 合すると、インスリンレセプター β 鎖に存在するいくつかの特定のチロ
 シン残基がレセプターのチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化され
 る。インスリンレセプターチロシンキナーゼは自己チロシンリン酸化に
 よってそのチロシンキナーゼ活性がさらに上昇する。このようにして活
 性化されたインスリンレセプターチロシンキナーゼは、細胞内に存在す
 るその基質である IRS (insulin receptor substrate) をチロシンリン
 酸化し、このチロシンリン酸化 IRS-1を Ash/Grb2やPI-3 キナーゼが認
 識して結合することによりシグナルが伝達され、最終的にグルコースの
 取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリンによる生物活性が発現
 することが明らかとされている (第9図参照、Goldstein, B. J. *et al.*
 ; *Receptor*, 3, 1-15, 1993, Kanai, F. *et al.* ; *Biochemical and*
Biophysical Research Communications, 195(2), 762-768, 1993)。しか
 し、このインスリンのシグナル伝達において、活性化されたインスリン
 レセプターを不活化する酵素、すなわちチロシン脱リン酸化酵素である
 プロテインチロシンホスファターゼ (Protein Tyrosine Phosphatase、
 以下、PTPと称する)の研究はほとんど進展していない。
- PTPに関する研究が本格的に始まったのは、1988年にFischerのグルー
 プによりヒト胎盤由来細胞質型のPTPであるPTP1Bの遺伝子がクローニ
 グされ、そのヌクレオチド配列が解明されてからである (Tonks, N. K.
et al. ; *J. Biol. Chem.*, 263, 6722-6730, 1988, Charbonneau, H.
et al. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。その
 結果、PTP1Bと相同性を示したのは既知のセリン/スレオニンホスファ
 ターゼではなく、造血系の膜貫通分子であるCD45の細胞質内領域の2カ所

あった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた

(Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988,
Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-
7186, 1988)。

5 現在までに多くのPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ
今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J.*
Exp. Med., 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*
, 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Bioph*
ys. Acta, 1095, 46-56, 1991)。PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ膜型

1 0 PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD
45、LARならびにPTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ および ζ)と、(2)細胞膜貫通部
分を持たない細胞質型PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、STEPおよ
びPTP1C) とに大別される。

膜型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分 (ドメイン 1およびドメ
1 5 イン 2、第1図(a)および(b)参照) を持っている。現在までに報告され
ているPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-
Gly (配列番号: 2) というシステインを含む配列 (signature motif) が
ホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフ
ィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成してお

2 0 り、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接関与している
ことが明らかにされた (Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-
1404, 1994)。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオ
ニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPと
セリン/スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示さ
2 5 れた。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における重要性は、
変異実験から明らかにされている (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9,

2399-2407, 1990)。これらのことから、ドメイン 1の保存されたCysが酵素活性発現に重要であり、またドメイン2は酵素の基質特異性を決めていると考えられている。

PTP酵素群のうち、ヒト由来の LARは、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) であるCD45のホスファターゼドメインをプローブとしてヒト胎盤ゲノムライブラリーによりクローニングされた、受容体型プロテインチロシンホスファターゼである (Streuli M. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 168, 1553-1562, 1988)。CD45が血球系の細胞に特異的に発現しているのに対して、LARは血球系以外の細胞、特に肝臓や骨格筋などのインスリン感受性組織に発現している (Goldstein B. J. ; *Receptor*, 3, 1-15, 1993)。多くの受容体型PTPの中でLARはその細胞外ドメインが細胞接着分子と類似しているため、特に興味深い。その全構造は、Ig様ドメインとフィブロネクチンIII型ドメインよりなる 150 kDaの細胞外E-サブユニットと、膜貫通領域および、2つのホスファターゼドメインを持つ細胞内ドメインを含む 85 kDaの P-サブユニット (配列番号 : 1 に示される) とが細胞膜のすぐ外側で非共有結合していることが明らかとなっている (第1図参照) (Streuli M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992)。

現在までにLARの機能的な役割が数多く報告されている。例えば、LARが欠損した神経細胞ではニューロトロフィンへの反応性が減少し (Yang, T. *et al.* ; 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana, USA, October 25-30, 1997, *Society for Neuroscience Abstracts*, 23, 1-2, 1997)、LAR活性の抑制によりアポリポプロテイン Bの分泌が減少すること (Phung, T. L. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(2), 367-371, 1997)、また、LARの発現が欠損することにより前脳基底部のコリ

ン作動性神経細胞のサイズが小さくなり、海馬歯状回でのコリン作動性神経支配が減少する (Yeo, T. T. *et al.*; *J. Neurosci. Res.*, 47(3), 348-360, 1997) ことが報告されている。このように、LARは生体内で様々な役割を担っていることが徐々に明らかになってきているが、現在最も注目が集められている研究として、LARとインスリン受容体との関係がある (Hashimoto, N. *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 267(20), 13811-13814, 1992)。

1995年、肥満者の脂肪組織において LARのチロシンホスファターゼ活性が異常に上昇しており、これがインスリン抵抗性の発症原因として、また、心臓血管疾患の危険因子として考えられ、注目されるべきであるとの発表が行われた (Ahmad, F. *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 95(6), 2806-2812, 1995)。以後、LARがインスリン受容体と密接に関与しているという報告が次々になされている (Mooney, R. A. *et al.*; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 709-712, 1997, Orr, S. R. *et al.*; *Biochemical Society Transaction*, 25(3), 452S, 1997, Ahmad, F. *et al.*; *J. Clin. Investigation*, 100(2), 449-458, 1997, Ahmad, F. *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 272(1), 448-457, 1997, Norris, K. *et al.*; *Febs Letters*, 415(3), 243-248, 1997, Li, P. M. *et al.*; *Cellular Signalling*, 8(7), 467-473, 1996)。そして、これらの情報に基づき、最近Ahmad, F. らのグループはLARおよびPTP1Bがインスリン抵抗性の治療ターゲットとなり得るかもしれないと報告している (Ahmad, F. *et al.*; *Metabolism, Clinical and Experimental*, 46(10), 1140-1145, 1997)。

現在までのLARおよびCD45等のPTPに関する研究より、細胞内情報伝達系においてPTPがPTKと共役して極めて重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.*; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。本発明者らは、これらの状況に鑑み、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに特異性を有し、且つCD45に対して特異性を有しない抗体の作製に着手した。

なお、既知のプロテインチロシンホスファターゼに対する抗体としては、CD45の膜貫通領域からホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体 (Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、これらの抗体がLARや、その他プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して如何なる免疫特異性を有するか否かは不明である。ゆえに、CD45に特異性を有さず、LARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を作製する必要もあった。

結節性甲状腺腫には、甲状腺腫瘍と過形成である腺腫様甲状腺腫がある。腺腫様甲状腺腫は多発結節性であるが、その一部に癌を併発していることが少なくない。結節性甲状腺腫の診断では癌を見逃さないことが重要である。現在、臨床においての甲状腺癌の診断は主に触診、超音波診断、穿刺吸引細胞診および組織切片による診断が行われている。甲状

- 腺腫は良性結節、乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、髓様癌および悪性リンパ腫等に分類され、また甲状腺癌を大きく分類すると分化型甲状腺癌（乳頭癌および濾胞癌）と未分化型甲状腺癌に分類することができる。大半は良性結節でありごくありふれたものであるが、はるかに数が多い良性結節の中から少数の悪性病変を確定的に診断するのは極めて困難である。
- 5 分化型甲状腺癌は手術中疑わしい部位があると切除し顕微鏡下で観察した後、癌であれば甲状腺全部を切除する。また、最初に血液検査、画像診断を行っても的確な診断ができないため、結局のところ組織切除に陥るのが常である。穿刺吸引細胞診も行われるが、組織切片による形態学的観察に比較して、細胞と細胞の結合が破壊されるために確定的な診断が下せない。さらに、ヨードシンチやテクネチウムシンチも確定的な判断材料とならない。癌細胞は正常甲状腺細胞に比べてヨードを取り込みにくい。多くの良性結節は放射性ヨードを取り込むが、放射性ヨードを取り込まずにコールドを示す良性結節も多く存在する。また、ホットを示す結節であっても癌である可能性も存在する。この様に、最終的には組織切片による形態学的診断に委ねられるが、この方法は正常と思われる部位であっても疑わしい場合には組織を切除される場合が存在し、また甲状腺摘出時に声帯を動かす反回神経を傷つける可能性が増大する。
- 1 0 ゆえに、臨床医あるいは病理医からは組織を切除する以前に正常と癌との区別ができる確定的な診断方法が切に望まれていた。
- 1 5
- 2 0

〔発明の開示〕

- 本発明は、LARのホスファターゼサブユニット、特に細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明によって、LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有、且つ他のプロテインホスファターゼには特異性を有しな
- 2 5

い抗体が提供される。

前記抗体は、配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるLARの細胞内ドメインに相当するポリペプチドまたはその断片を抗原として調製されるものが好ましく、また免疫特異性の点からモノクローナル

5 抗体であるとよい。

そして、係る抗体は、LARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を免疫原として用いることによって調製することができる。係る融合タンパク質を構成する、その他のタンパク質またはポリペプチド断片として、特にGST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）が好適であるが、他にも、ポリヒスチジン（好ましくは6個のヒスチジン）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、プロテインA等を用いてもよい。

10

尚、ポリヒスチジンを用いた場合、遺伝子組換え法にて発現させた融合タンパク質を単離精製するためには、ニッケルキレーティング樹脂への吸着を利用することができ、pH変動の他、EDTAまたはイミダゾール物質を添加することによって当該樹脂から解離することができる。CBPを用いた場合、発現させた融合タンパク質はカルモジュリンアフィニティー樹脂を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後EGTAを加えることにより当該樹脂から解離することができる。また、プロテインAを用いた場合、発現させた融合タンパク質はIgGセファロース（例えば、IgGセファロース6FF）カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後pH変動によって当該樹脂から解離することができる。

15

20

さらに前記融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片の別の例として、Xpress、Thioredoxin、c-myc、V5およびHA/c-myc等を挙げることができ、これらをエピトープとして認識することができ

25

る抗体を用いて、目的とするLARホスファターゼドメインとの融合タンパク質を発現した後に抗原-抗体アフィニティーカラムにより単離・精製することができる。

- 前記した、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインとを含む融合タンパク質は、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20～30℃にて16～24時間、特に好ましくは、23～25℃にて18時間培養し、その培養液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施すればよい。この界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPS (硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン)、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド (1-0-n-ドデシル-β-D-グルコピラノシル(1-4)α-D-グルコピラノシド)、ノニデット (商品名) P40 (エチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)、n-オクチルグルコシド (1-0-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド)、モノラウリル酸シュクロース、テシット (商品名)、ドデシルポリ (エリレングリコールエーテル)n)、トリトン (商品名) X-100 (オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)、ツィーン (商品名) 20 (ポリ(オキシエチレン)n-ソルビタン-モノラウレートレート)、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート [以上、いずれもnは1以上の整数を表す] 等が挙げられる。融合タンパク質を溶出させる場合に、これら

の界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を、得ることができる。

- 5 このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を取得する場合、抗体のスクリーニングにはLARのホスファターゼサブユニットを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

10 本発明のモノクローナル抗体として、例えばマウス／マウスのハイブリドーマにより産生される、約150 kDaの分子量を有する抗体を含むモノクローナル抗体が挙げられる。かかる抗体は、インスリンのシグナル伝達機構のさらなる解明のためのツールとして、またインスリン抵抗性およびNIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療、診断等に応用できる。

- 15 そして、LAR関連分子、例えば、モジュレーター、結合タンパク質などの同定や取得にも本発明の抗体が有用である。

20 本発明によってさらに、前記モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系が提供される。このハイブリドーマ細胞系として、本発明者によって1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された、受託番号がFERM BP-6343であるマウス／マウスハイブリドーマ細胞系YU1が挙げられる。

- 25 本発明の抗体は、天然産物由来または全体もしくは部分合成（化学合成、遺伝子組換えによる合成等）された、LARタンパク質ならびに少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片およびポリペプチド（以下、この断片およびポリペプチドを総称して「LAR由来分子」と称する）に対して特

異的な免疫反応性を有する。

さらに本発明は、LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原として前記したようなLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質、好ましくはGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることを特徴とする方法を提供するものである。ここで、GST以外に使用可能な、融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片、その融合タンパク質の精製方法は、前記したとおりである。

10 また、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインとを含む融合タンパク質は、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20～30℃にて16～24時間、特に好ましくは、23～25℃にて18時間培養し、その培養液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施すればよいことも前述のとおりであり、融合タンパク質を溶出させる場合に、これらの界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を得ることができる。

25 このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を調製する方法において、抗体のスクリーニングにはLARのホスファター

ゼサブユニットを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

5 本発明によって、LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法が提供される。この方法は、如上の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドの量を測定する工程を含むことを特徴とする。この方法においてLARまたはLAR由来分子の量を測定するために、前記抗体が、好ましくはイムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される。

1 0 本発明のさらなる特徴において、如上の抗体を用いて被検試料よりLARおよび／またはLAR由来分子を単離し、単離されたLARおよび／またはLAR由来分子の活性を測定する工程を含む定量方法が提供される。かかる方法において、LARおよび／またはLAR由来分子を単離するために、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび
1 5 /または免疫沈降が好適に用いられる。すなわち、前記抗体を結合させた担体に被検試料を接触させて抗原（LAR／LAR由来分子）－抗体間の特異的な相互作用を許容し、次いで担体を洗浄した後、結合されたLAR／LAR由来分子を溶出する工程を含む、カラム法、バッチ法等によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が実施されるとよ
2 0 い。

本発明の別の特徴において、如上の抗体を用いてLARおよび／またはLAR由来分子を単離する工程を含む、LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法が提供される。この生産方法における目的物の単離は、上記LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法にお
2 5 けると同様に、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が好適に用いられる。

また、本発明でさらに企図されるのは、LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた *in situ* 免疫組織染色などの技術が採用され、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出するものである。

本発明はさらに、甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体を企図する。この抗体は、LAR分子のみならず、その断片例えば、ホスファターゼドメイン、細胞外ドメイン等を抗原とした抗体であつてよく、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、ペプチド抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR-移植抗体などが含まれる。特に、如上のLARのホスファターゼサブユニットに対する抗体で、甲状腺癌細胞との免疫反応性を有するものが本発明によって提供される。甲状腺癌細胞に対して特異的免疫反応を有するとは、正常の甲状腺細胞や良性腫瘍の甲状腺細胞には殆ど反応せず（正常細胞の約10%以下）、癌化した甲状腺細胞によく反応する（癌細胞の約20%以上）ことを意味する。

従って、この抗体を利用して、甲状腺癌を診断することが可能になり、本発明において甲状腺癌の組織診断方法を企図するものである。この診断方法は、甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料を採取し、前記抗体と当該組織試料との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする。この場合、甲状腺組織試料は、被験者より注射針等を用いた穿刺吸引細胞診により採取した試料でも、また甲状腺の一部を切除、摘出して調製した甲状腺組織切片等のいかなる試料でもよい。穿刺吸引細胞診により採取した試料を用いる診断方法は、被験者に対する侵襲性が低いという点でより好ましい。これ

は、従来の組織形態学的検査に基づく甲状腺癌診断法では、組織を無傷な状態で採取しなければ判定し得ず、そのため侵襲性の高い切開法を余儀なくされていたことに鑑みて本発明により提供される重要な利点である。なお、組織切片を用いた診断においても、従来の方法よりも格段に

5 診断の信頼性が高いので有用である。

前記診断方法において、穿刺吸引細胞診により得られた試料は、本発明の抗体を用いて例えばイムノブロッティング、免疫沈降またはELISA等の、汎用されているin vitroのイムノアッセイによって免疫反応性が評価される。そして、組織切片を試料とした場合、従来の免疫反応を利用した組織染色によって免疫反応性が判定される。

10

さらに本発明は、甲状腺癌の組織診断用組成物であって、上記抗体を含むことを特徴とする組成物を提供する。この組成物を用いて、前記したとおり信頼性の高い甲状腺癌の診断方法を実施することができる。組成物には、本発明の抗体の他に、適宜の賦形剤、担体、緩衝液、抗体を

15 安定化するための薬剤等を配合するとよい。

このように、本発明によって、LARが甲状腺癌細胞に特異的に高発現することが判明した。また、実施例に示すように本発明のモノクローナル抗体が甲状腺癌の診断に有用であることも証明された。さらに、本発明のモノクローナル抗体が組織切片を用いた甲状腺癌の診断に有用であり

20 (実施例5、6参照)、また組織をホモジナイズした方法による診断にも有用である(実施例7参照)ことが判明した。以上の結果より、当業者であれば本発明のモノクローナル抗体は種々の細胞診あるいはバイオプシーに有用であることが理解できる。さらに、本発明のモノクローナル抗体のみならず、LAR細胞外ドメインを認識することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および／またはペプチド抗体をも利用

25 することができる。この場合であっても本発明のモノクローナル抗体と

同様に実施できるが、細胞外ドメインの解離による影響を考慮するのが好ましい。

5 本発明によりLARに対する抗体は、甲状腺癌に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能であることが判明した。これらの抗体を用いて、LARまたはその断片との免疫学的な結合に基づき、LARまたはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてLARまたはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりLARまたはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化LARと検体中のLARまたはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のLARまたはその断片を測定する競合法を利用して検体中のLARまたはその断片を測定する方法が挙げられる。

10 サンドイッチ法によるLARまたはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とLARまたはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-LARもしくはLAR標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびLARまたはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

20 測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ビリジリジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジバルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

抗体を標識する物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エス

テル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニドロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイノージー(β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて

既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

本発明はまた、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化（ターゲッティング）されたことを特徴とするDDS製剤を提供する。

甲状腺癌に関与する遺伝子はこれまでに種々明らかにされてきている。乳頭癌患者の一部でRETやTRK遺伝子のチロシンキナーゼドメインの変異が認められた (Fusco, A. et al. ; Nature, 328, 170-2, 1987)。またRETの変異は過去に放射線被曝の既往のない乳頭癌患者の3-30%に見られ (Santoro, M. et al. ; J. Clin. Invest., 89, 1517-22, 1992、Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996、Zou, M. et al. ; Cancer, 73, 176-80, 1994)、チェルノブイリ原発事故の際、被曝した子どもおよび小児時代に放射線の外照射を受けた既往のある患者から診断される乳頭癌では、RETの変異は60-80%と高率に見出され (Fugazzola, L. et al. ; Cancer Res., 55, 5617-20, 1995、Klugbauer, S. et al. ; Oncogene, 11, 2459-67, 1995、Nikiforov, Y. E. et al. ; Cancer Res., et al. ; 57, 1690-4, 1997、Bounacer, A. et al. ; Oncogene, 15, 1263-73, 1997)、TRK遺伝子変異の頻度は極めて低い (Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996)。RAS遺伝子の点変異は甲状腺腺腫と

甲状腺濾胞癌において高頻度に見られる。これはRAS遺伝子の点変異は腫瘍発生初期の段階であると考えられている (Fagin, J. A. ; Molecular pathogenesis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 7th ed.

- 5 Philadelphia: Lippincott-Raven, 909-16, 1996、Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995) 。TSHや刺激性G蛋白をコードしている遺伝子の活動性変異が一部の甲状腺濾胞癌において報告されている (Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995、Russo, D. et al. ; Oncogene, 11, 1907- 11, 1995) 。さらに癌抑制遺伝子である
- 1 0 p53の不活性点変異は分化型甲状腺癌では希であるが、未分化癌では高頻度に認められることも報告されている (Fagin, J. A. et al. ; J. Clin. Invest., 91, 179-84, 1993、 Ito, T. et al. ; Cancer Res., 52, 1369-71, 1992) 。

- 1 5 これら公知の情報から、甲状腺癌の治療または診断を目的とした核酸を、LARに対する抗体によりターゲッティングされたDDS製剤中に含有させることができる。

- また、甲状腺腫瘍細胞の増殖は甲状腺刺激ホルモン(TSH)によって調節されており、甲状腺ホルモン剤投与による甲状腺刺激ホルモン(TSH)分泌の抑制は、再発や生存率を改善することも知られている。ゆえに、TSHの
- 2 0 作用を阻害するようなタンパク質、核酸あるいは化合物もDDS製剤中に含有させることができる。

- 一方、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化されたことを特徴とする本発明のDDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される1以上の物質を含んでもよく、かような物質を製剤中に配合することによって、癌化した甲状腺細胞への標
- 2 5

的化能を高めたり、甲状腺癌の治療または診断に用いることが可能となる。

- 5 ここで云う核酸としては、宿主細胞において発現可能な蛋白質をコードする核酸、細胞由来遺伝子のアンチセンス核酸、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする遺伝子あるいは転写調節因子の結合部位の配列または類似の配列を有するデコイをコードする核酸、各細胞由来の mRNA を切断するリボザイム、自殺遺伝子等が挙げられる。

- 10 アンチセンス核酸とは、複製、転写、翻訳等の遺伝子発現のある段階において、将来発現されうる核酸配列に対して特異的に結合する核酸もしくは核酸配列を示し、結果として将来発現されうる核酸配列の発現を阻害するものである。アンチセンス核酸には三重鎖によるアンチジーン核酸も含まれる。デコイをコードする核酸とは、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする核酸あるいは転写調節因子の結合部位の配列または類似の配列を有する核酸を示し、これらを、図として細胞内に導入することで、転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、転写調節因子の作用を抑制し、最終的には活性化される遺伝子群を抑制することができる可能性がある。本明細書で言うリボザイムとは特定の蛋白質の mRNA を切断するものをいい、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものを言う。リボザイムは特定の蛋白質をコードする遺伝子配列より設計可能
- 15 であり、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピンリボザイム、デルタ型リボザイムなどのリボザイムの種類に関わらず、特定の蛋白質の mRNA を切断するもので、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものであれば本明細書で言うリボザイムに含まれる。本明細書で言う自殺遺伝子とは、プログラム細胞死誘発遺伝子、アポトーシス誘発遺伝子、ネクローシス誘発遺伝子等を含むし、結果的に細胞を死に導く遺伝子を言う
- 20 。
- 25 。

これら核酸は当業者により適宜選択することができ、該核酸をDDS製剤に含有させることにより、甲状腺癌細胞特異的に細胞を死滅させることができる。

放射性ヨード ($^{131}\text{-I}$) を添加することによって、正常甲状腺細胞が破壊され、従って、全身放射性ヨードシンチ検査での癌転移が検出しやすくなる。また、血中サイログロブリン値を測定することにより、癌の取り残しや再発が確認できる。さらに、放射性ヨード治療は潜在性の癌を破壊することにより再発を防止することができ、治療のために大量の放射性ヨードを使用することで、全身放射性ヨードシンチ検査を可能にする。

10 この検査は癌の取り残しを見つけるのに大変感度がよい。ゆえに、本発明の抗体またはヨード標識あるいは放射性ヨード標識された抗体を用いることによりさらに診断・治療における有用性が高まる。

また、タンパク質としては、抗体、TSH（甲状腺刺激ホルモン）および甲状腺ホルモン等が挙げられる。

15 上記したとおりの構成成分を含む前記DDS製剤は、甲状腺癌の診断用医薬組成物や、甲状腺癌の治療用医薬組成物として有用である。

さらに、本発明の医薬組成物は、甲状腺癌を化学療法剤を用いて治療することが意図される場合に、化学療法剤とLARに対する抗体を組合せ、この抗体が特異的免疫反応性にに基づき甲状腺癌に結合することを利用し

20 て病変部位へ薬物を濃縮させ、副作用の少ない有効な化学療法を実施することを可能とするものである。

ここで甲状腺癌治療に有効な化学療法剤として、シクロフォスファミド、アドリアマイシン、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル、ダカルバジンおよびビンクリスチン等の抗癌剤を用いることができる。

25 前記医薬組成物の投与方法は、全身投与あるいは局所投与のいずれでもよい。全身投与として、経口投与、静脈内投与、皮下、筋肉注射およ

び直腸投与等があり、局所投与として、甲状腺組織内への直接投与もしくは甲状腺組織に連絡している血管内に投与することが好ましい。

本発明の医薬組成物の投与量は、薬物の公知の有効血中濃度に依存し、当業者が適宜選択するところである。また、以下に示すリボソーム製剤の場合、抗体の量はリボソームが形成するのを妨げない量を用いることが重要である。

なお、DDS製剤に含有せしめられる抗体は、特にヒトに投与する場合、前記示したヒト化抗体もしくはキメラ抗体等のヒトに対して免疫原性を有さないあるいは極力抑えた抗体を用いるのが好ましい。マウスモノクローナル抗体をヒトの体内に投与すると、ヒトにとっては異種タンパクであるので種々の副作用が起こる危険性がある。そこで、ヒトモノクローナル抗体が望ましいが、融合効率が悪くまた抗体産生が安定なハイブリドーマを得ることは難しかった。しかし、現在技術は進歩しヒトモノクローナル抗体またはキメラ抗体を作製することが可能となっている。

キメラ抗体とはマウス抗体とヒト抗体のキメラ分子をいう。ヒトに任意の抗原を免疫して抗体を製造することは倫理上不可能である。ゆえに、マウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（V領域）を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部（C領域）遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させれば、ヒト・マウス・モノクローナル抗体が産生できる。キメラ抗体はヒトに対する抗原性が少ないため、ヒト体内に投与する治療用や画像診断用モノクローナル抗体等として利用できる。公知のキメラ抗体の関連技術として、特開平05-304989号、特開平04-330295号、W09106649、特開昭63-036786号、特公平06-98021号等がある。

しかし、最近キメラ抗体よりも有用であるといわれるヒト化抗体が開

発された。ヒト化抗体とは抗体分子の抗原結合部位（CDR：

Complementary determining region、相補性決定領域）の遺伝子配列のみをヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトイング）し、抗体分子のCDRを除いた全分子をヒト化した抗体である。本抗体はヒト・マウス・キメラ

5 抗体より、マウスの抗体部分が少ないため、抗原性が少なく安全性が高いと言われている。我が国では現在、成人性T細胞白血病に対するヒト化抗体の臨床試験が行われている。ヒト化抗体の製造方法およびその関連

技術については、米国Genentech社（W09222653、W09845332、W09404679

、W09837200、W09404679、）および英国Celltech社（W09429451、による

1 0 W09429351、W09413805、W09306231、W09201059、W09116927、W09116928、W09109967、W08901974、W08901783）等の特許出願がある。

ヒトモノクローナル抗体の作製方法には細胞融合法以外にも、エプスタイン・バー（Epstein-Barr）ウィルス（EBV）で形質転換する方法、

さらにはその形質転換した細胞を親細胞と融合させる方法、遺伝子工学

1 5 を利用しキメラ抗体、ヒト化抗体を作製する方法などがある。キメラ抗体とは異種の動物の免疫グロブリン遺伝子断片をつなげて作製された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスなどにヒトにとって異種の抗体を改変

して、H鎖とL鎖の相補性決定部（CDR）以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置換し他抗体をいう。ヒトモノクローナル抗体作製用

2 0 の親細胞は、ヒト／マウスのヘテロミエローマであるSHM-D 33株（ATCC

CRL 1668）またはRF-S1株を用いるとマウスの親細胞と同等の高い融合効率が得られる。これらの親細胞を用いて得られたハイブリドーマはフ

ィーダー細胞なしでクローニングが可能であり、IgGタイプの抗体を比較的安定にしかも大量に産生することができる。親細胞の培養には、15%F

2 5 CSを加えたERDF培地を用い、その他の操作はマウスの場合と同様である

。また、IgGタイプのヒトモノクローナル抗体を作製するには抗原で充分

に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。
 十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合にはin vitroで抗原感作を行うこともできる。

上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

また、そのような抗体をヨードで放射標識するあるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、診断・治療薬として有用性が増す場合がある。

乳頭癌や濾胞癌が一度血流に乗って周囲の組織、または離れた部位(特に肺と骨)に転移した場合、腫瘍を破壊するために放射性ヨード(^{131}I)を投与するのが一般的な治療となっている。正常甲状腺細胞は血液からヨードを取り込み濃縮する。そしてこの過程は下垂体からのTSH(甲状腺刺激ホルモン)により刺激される。その後ヨードは甲状腺ホルモン(サイロキシンT4)を作るのに使われる。上記述べたように、甲状腺癌または甲状腺癌が転移したものは、正常な場合はごくわずかの量のヨード(または放射性ヨード)しか取り込まない。しかし、大量のTSHの影響下にある時は、甲状腺癌、またはその転移したものの一部は刺激を受けて、相当量のヨードを取り込むようになる。これにより、周囲の組織を損なうことなく、癌に直接大量の放射線が照射されることになる。甲状腺が存在しており、正常な量の甲状腺ホルモンを産生している場合は、下垂体のTSHの産生量は比較的低いままに留まっているが、甲状腺全体が取り除かれたり、破壊されたりして甲状腺ホルモンのレベルが下がると下垂体はTSHの分泌を急激に増加する。このTSHが甲状腺癌を刺激し、放射性ヨードを取り込むようにする。広がった甲状腺癌に対し、放射性ヨード療法を行なう場合は、甲状腺全体を手術でほぼ完全に除去し、残留した組織を放射性ヨードを使って破壊する必要がある。一度これを行なったら

、首に腫瘍が残っているか、離れた場所に転移があることがわかっている患者には、TSHのレベルが十分に高ければ、試験量の放射性ヨード(通常は約2から10ミリキュリー)を使ってスキャンを行う。もし、相当量のヨードが甲状腺癌の領域に集まっていれば、さらに大量の治療量の放射性ヨード(通常100-200ミリキュリー：3700から7400MBq)を与え、腫瘍の破壊を試みる。より浸潤性の強い甲状腺癌のある患者に対しても、放射性ヨードが安全で有効であるため、多くの医師がそれ程浸潤性の強くない乳頭癌や濾胞癌にも、放射性ヨードを日常的に使うようになっている。

10 ゆえに、LARに結合する抗体をヨード標識する、あるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、さらに甲状腺癌細胞への特異性を増強し、治療または診断に用いることができる。

この様に甲状腺癌細胞を特異的に認識する抗LAR抗体はドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System: DDS)においても有用である。ドラッグデリバリーシステム(橋田充；ドラッグデリバリーシステム 創薬と治療への新たな挑戦，化学同人(1995))は、薬物の投与方法や形態を工夫し、体内での薬物動態を制御することにより薬物を標的部位に選択的に送り込み、結果として最適の治療効果を得、さらに薬物による副作用を最小限にとどめることを目的とした薬物投与に関する新しい技術である。現在までに様々な DDS製剤が開発されているが、なかでもリボソーム製剤(寺田弘，吉村哲朗編；ライフサイエンスにおけるリボソーム実験マニュアルシュプリンガー・フェアラーク東京(1992))は欠損酵素の補充、制癌剤および抗生物質の投与、さらには遺伝子治療の分野においても脚光を浴びている。

20 リボソームは生体膜を構成しているリン脂質を基本とする脂質二重層

25 リボソームは生体膜を構成しているリン脂質を基本とする脂質二重層

からなる閉鎖型小胞体であり、安全性が高く、脂質膜と水層の部分から構成されているため、脂溶性・水溶性を問わず様々な薬物を内包することができるという、優れた薬物キャリアーとしての機能を有している事が知られている。

- 5 さらに、リボソームの表面に抗体やペプチド等を結合することでターゲティング能を付与できることは公知の事実である (Kazuo Maruyama, Tomoko Takizawa, Motoharu Iwatsuru et al. ; *Biochimica et Biophysica Acta* 1234, 74 (1995)) (Jlbao Zhao, Shunsaku Kimura, Yukio Imanishi ; *Biochimica et Biophysica Acts* 1283, 37 (1996))。
 - 1 0 すなわち、抗LAR抗体は様々なリボソーム製剤における甲状腺癌細胞への特異性を高める目的で使用され得る。さらに脂質の種類を変化させたり、ポリエチレングリコール等で修飾することにより、温度感受性リボソーム (Sakae Unezaki, Kazuo Maruyama, Motoharu Iwatsuru et al. ; *Pharmaceutical Research* 11, 1180 (1994))、血中安定性リボソーム (Kazuo Maruyama, Tsutomu Yuda, Motoharu Iwatsuru et al. ; *Biochimica et Biophysica Acta* 1128, 44 (1992))、プラスミド導入ベクターとしてのカチオニックリボソーム (Xlang Gao, Daniel Jaffurs, Leaf Huang et al. ; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200, 1201 (1994)) 等、種々の性質の異なるキャリア (ベクター) を作製できるという特性を有している。
 - 2 0
 - 2 5
- しかしながら、通常、リボソームはエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、細胞膜近傍の初期エンドソーム内に取り込まれる。その後、細胞深部の後期エンドソームに送られ、そして最終的にはライソソームへと運ばれる。ライソソームへ運ばれたリボソームは加水分解酵素の作用により分解され、同時にリボソーム内に封入された薬物等も代謝されるため、薬物などが未変化体の状態で細胞質内に到達する割合

が極端に低下するという問題があった。

現在では細胞のバリアーである細胞膜に障害を与えることなく細胞質に直接薬物等を導入する方法が検討されている。例えば、リボソームが膜融合能を獲得すればライソゾームを経由することなく、直接薬物等を細胞質ゾルまで送達することが可能となる。これまでに、リボソームを細胞へ融合させる方法として pH感受性リボソーム(Kenji Kono, Ken-ichi Zenitani, Toru Takabishi; *Biochimica et Biophysica Acta* 1193, 1(1994))およびウィルスのエンベロープ蛋白質をリボソームに組み込んだ再構成リボソーム(Sangeeta Bagai, Debi P. Sarkar; *The Journal of Biological Chemistry* 269, 1966(1994))で検討されている。

最近、センダイウィルス(sendai virus : hemagglutinating virus of japan) (Yoshio Okada; *Current topics in Membranes and Transport* 32, 297 (1988))の膜融合能をリボソームに付与した膜融合リボソーム(fusogenic liposome : HVJ-liposome)が報告されている。センダイウィルス(HVJ)は細胞間融合現象(Y. Maeda, J. Kim, Y. Okada et al; *Experimental Cell Research* 108, 108 (1977))が認められたことから、動物細胞を用いた遺伝学の先駆けになったウィルスである。さらに、HVJはリボソームとも融合することができ(Mahito Nakanishi, Tsuyoshi Uchida, Yoshio Okada et al. ; *Experimental Cell Research* 159, 399 (1985))、その融合体(HVJ-リボソーム)はさらに細胞膜と融合する。つまり、リボソームと HVJを直接反応させて作製した HVJ-リボソームはいわゆるハイブリッドベクターであり、内部にリボソーム由来の空洞を有し、外側はウィルスエンベロープと同じスパイク構造を有している。HVJ-リボソームは蛋白質、化学物質および遺伝子等、リボソーム内に封入できるものであればあらゆる物質をセンダイウィルスと同等の高

い効率で細胞内に導入することができる。(Tetsuhiko Nakagawa, Hiriyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi ; Drug Delivery System 11, 411 (1996))。また、例えば HVJ-リボソームの改良型として、DNA結合能を有する核蛋白質である HMG-1(Non-histone chromosomal protein, High Mobility Group-1)を DNAと共導入することにより、さらに導入

5 効率が向上するという報告もある(Yasufumi Kaneda et al. ; J. Molec. Medicine 73, 289 (1995))。

膜融合リボソームの別の例として、VSV(Vesicular Stomatitis Virus : 水疱性口内炎ウィルス)(永井美之, 石浜明監 ; ウィルス実験プ

1 0 ロトコール, Medical View(1995))を利用したリボソーム製剤も利用できる (J. Virol., 72(7), 6159-63, 1998, Exp. Cell. Res., 200(2), 333-8, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(7), 2448-51, 1990, Biochim. Biophys. Acta, 987(1), 15-20, 1989) 。VSVはラブドウィルスのベシクロウィルス属に属する(-)単鎖 RNA型ウィルスで、膜表面に

1 5 エンベロープ蛋白質である G蛋白質を有している(Akihiko Kawai ; Journal of Virology 24, 826 (1977))。VSVの細胞への感染機構はリボソームと同様、エンドサイトーシス経路により行われる。しかし、VSVはリボソームとは異なり、エンドソーム膜と融合する特性を有しているため、ライソゾーム内の加水分解酵素による分解を受けることなく、自

2 0 身の遺伝子を細胞質内に導入している。これまでに、VSVが膜融合能を有し、ヒト赤血球に対して溶血作用を示さないことが知られている (Carole A. Bailey, Douglas K. Miller, John Lenard ; Virology 133, 111(1984))。また、VSVは多くの組織細胞に普遍的に存在するフォスファチジルセリンを受容体とするため、宿主域が広く (Michael J.

2 5 Clague, Christian Schoch, Robert Blumenthal ; Biochemistry 29, 1303 (1990))、さらにウィルス増殖が速いことから大量のウィルスが採

取できるという特徴を有している。一方、VSVとリボソームが融合することが報告されている(Satoshi Yamada, Shunichi Ohnishi; Biochemistry 25, 3703 (1986))。

5 この様に、抗LAR抗体は膜融合リボソーム、pH感受性リボソーム、再構成リボソーム、カチオニックリボソーム等またはこれらを修飾したあらゆるリボソーム製剤のターゲッティング能を高める目的で利用することができる。

1 0 その他、モノクローナル抗体を用いてターゲッティング能を高める方法およびその有用性が多数報告されており (Hum. Antibodies, 9(1), 61-5, 1999、J. Clin. Pharm. Ther., 22(1), 7-19, 1997、J. Int. Med. Res., 25(1), 14-23, 1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (24), 14164-9, 1996、Hepatology, 22(5), 1482-7, 1995、Hepatology, 22(5), 1527-37, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(15), 6986-90, 1995、Immunomethods, 4(3), 259-72, 1994、J. Drug Target, 1 5 , 2(4), 323-31, 1994、Cancer Res., 57(10), 1922-8, 1997、Crit. Rev. Biotechnol., 17(2), 149-69, 1997、Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 16(7), 505-12, 1994、Trends Biotechnol., 12(6), 234-9, 1994、Bioconjug. Chem., 4(1), 94-102, 1993)、甲状腺癌の治療において前記記載した文献あるいは公知の技術に準じてLARに対する
2 0 モノクローナル抗体が利用できる。

その他、ウイルスベクターによる遺伝子治療や、ポリ酸・グリコール酸マイクロスフェア、リピッドマイクロスフェア、ポリエチレングリコール修飾酵素等を用いたDDS製剤においても本発明の抗LAR抗体を利用し、甲状腺癌への標的化を図ることができる。

2 5 さらに別の実施態様として、甲状腺癌細胞においてLARが高発現していると言うことは、LAR分子をコードする核酸配列から高率にmRNAへの

転写が行われ、翻訳されているものと理解できる。ゆえに、当業者であればmRNAに対するプローブを用いることによりLAR mRNAの発現量を測定することにより癌の診断を行うことは容易である。

5 また、本発明の結果、甲状腺癌細胞において該転写を促進させる転写因子、プロモーター、エンハンサー等の分子生物学的研究に多大な貢献をすることができる。

〔図面の簡単な説明〕

1 0 第1図は、LARのサブユニット構造を示す模式図(a)、および実験例にて調製したLARの膜内ホスファターゼドメイン構造の変異体を示す模式図(b)である。

第2図は、LAR C/Sとインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞において、インスリン刺激により誘導されるチロシンリン酸化の時間経過を示すイムノブロットの写真である。

1 5 第3図は、LARの野生型または変異体とインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞における、リン酸化-脱リン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第4図は、LARの野生型または変異体によるインスリンレセプターβ鎖の脱リン酸化を示すイムノブロットの写真である。

2 0 第5図は、インスリンレセプターの野生型または変異型とLAR C/SとをコトランスフェクトしたCOS細胞におけるチロシンリン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第6図は、本発明の抗体YU1の分子量を示す、SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真である。

2 5 第7図は、本発明の抗体YU1のLARに対する免疫特異性を示すイムノブロットの写真である。

第8図は、インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化を示すイムノブロットの写真である。

第9図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

第10図は、本発明の抗体YU1を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べたイムノブロッティングの結果を示す図である。

第11～13図は、本発明の抗体YU1を用いたヒト甲状腺癌組織切片の免疫染色における、癌化細胞の選択的染色結果を示す写真である。

第14図は、本発明の抗体YU1のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常および癌化甲状腺組織のイムノブロッティングの結果を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

[実験例1] LAR変異体によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化ならびにLARとインスリンレセプターとの会合に関する検討

先ず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするために、LARのPTPドメインの触媒活性中心に存在するシステインをセリンに変換することにより作製した、変異型LARを用いるというストラテジーにより解析を進めた。

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

LAR発現ベクターとして、(a)LAR WT：ヒト野生型LAR（配列番号：3）、(b)LAR C/S：LAR-PTPドメイン1の活性中心にあるシステイン（配列番号：3のアミノ酸第1522位）を、配列番号：3のヌクレオチド第4983位のGをCに置換することによりセリンへと変換したもの、ならびに(c)LAR DC/S：LAR C/Sにおける変異に加えて、さらにLAR-PTPドメイン2の

システイン（配列番号：3のアミノ酸第1813位）を、配列番号：3のヌクレオチド第5856位のGをCに置換することによりセリンへと変換したものの3種（第1図(b)参照）を、pMT発現ベクターに組み込んだもの（Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992およびStreuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990を参照）を用いた。

一方、インスリンレセプターの発現ベクターは、(a) IR WT：野生型、および(b) IR K1018M：野生型のインスリンレセプターのATP結合部位の、第1018位のリジンをメチオニンに変換してチロシンキナーゼ活性を欠失させたインスリンレセプター変異型の2種類の cDNAを、SR α プロモーターの下流に組み込んだもの（Kanai F. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195, 762-768, 1993を参照）を用いた。

b. COS-7細胞へのトランスフェクション

COS-7細胞を 1.0×10^5 細胞数/8 mL/90 ϕ ディッシュとなるように10% 牛胎児血清添加 RPMI 1640培地（日水製薬株式会社）に播種して 16時間培養を行った後、LAR C/Sと IR WTの発現ベクターを DEAE-デキストラン法を用いて COS-7細胞にコトランスフェクションした。用いたLAR C/Sは前記①(b)に記載のとおりに変異させることにより、*In vitro*でチロシンホスファターゼ活性が完全に欠失していることが明らかにされている（Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990）ものである。

コトランスフェクションは、以下の手順に従って行った。まず 2% FCS を含有する RPMI 1640 培養液（グルタミン0.3 gおよびカナマイシン0.1 gを含む、RPMI 1640培地（日水製薬株式会社） 10.2 g/L、10% NaHCO₃でpH 7.4に調整）4 ml に、40 μ lの10 mM クロロキンを加えた。この溶液 2 ml に、LAR 発現ベクター5 μ gおよび IR 発現ベクター1 μ gを加え、残りの溶液 2 ml には16 μ l の100 mg/ml DEAE-デキストランを

加えた。次いで双方の溶液をよく攪拌混合した。こうして調製した発現ベクター溶液 3.75 ml を、 1.0×10^6 細胞数/8 ml/ディッシュ となるように播種し、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で 16 時間前培養しておいた COS-7細胞に加えた。前培養と同様の条件で4 時間培養した後に10

5 % DMSO溶液で 2 分間処理し、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) で洗浄後、10% FCS を含有する RPMI 1640 を8 ml 加え、37 °C、5% CO₂ に調整したインキュベーター内で 48時間培養した。

c. インスリン刺激と細胞溶解液調製

- 1 0 トランスフェクション終了後のCOS-7細胞を血清無添加RPMI 1640 培養液中で16時間培養し、 10^{-7} Mインスリン（生化学工業社製）で一定時間すなわち、0、1、5、15および 30分間の刺激を行った。但し 0分刺激とは、インスリン刺激を行ったが、氷上に放置し、37°Cでインキュベートしなかったものである。インシュリン刺激開始より各時間経過後に、培養液をすべて吸い取り、直ちに PBS w/Inh. (チロシンホスファターゼインヒビター含有PBS : 1 mM バナジウム酸ナトリウム、5 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、5 mM EDTA·2Na、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) を5 ml 加えた。
- 1 5 PBS w/Inh. で細胞全体を洗浄してから液体を吸引除去し、細胞に溶解用
- 2 0 バッファー (1% Nonidet P-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、5 mM EDTA、10 mM ヨードアセタミド、10 mMフッ化ナトリウム、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.4 mM バナジウム酸ナトリウム、0.1 mM 酸化フェニルアルシン、1 mM ベンズアミジン、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル) を1ml 加え、セルスクレイパーを用いて細胞を
- 2 5 集めた。この細胞懸濁液を 1.5 mlチューブに移し 4 °Cで 30 分間インキュベートすることにより、細胞を完全に溶解させた。インキュベート

後の液体を12,000 rpm、4 °Cにて10 分間遠心分離して得られた上清を、細胞溶解液として以下の実験に用いた。

d. 免疫沈降

- c. で得られた細胞溶解液につき、抗 LAR E-サブユニット抗体 (7.5 μ gの11.1Aと7.5 μ gの753.Aとの混合物 (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992参照) を用いた免疫沈降を行った。前記細胞溶解液 1 ml に対してモックとしてMOPC 21 (マウスIgG1 κ : Sigma社製) を15 μ g加え、4 °Cで1 時間インキュベート後、 γ -bind (GammaBind Plus Sepharose : Pharmacia Biotech社製) 20 μ lを加え、さらに 4 °Cで 1 時間インキュベートすることにより前吸収を行った。4 °C、12,000 rpm にて10 分間遠心分離を行い、上清 950 μ lを別のチューブに移した。抗 LAR E-サブユニット抗体を15 μ g 加え、4 °Cで1 時間インキュベート後、 γ -bind を20 μ l加え、さらに 4 °Cで1 時間インキュベートした。12,000 rpm、4 °Cにて10 分間遠心分離後、沈査を 1 ml 溶解用バッファ
- 1 0 ーで2回、PBS w/Inh. で1 回洗浄し、20 μ l のSDSサンプルバッファーに懸濁した。これを沸騰水中で 5分加熱し、電気泳動用の検体とした。
- 1 5

e. イムノブロッティング

- 上記検体を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、トランスファー装置を用いて400 mAで4 時間ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) に転写した。この膜を3% ウシ血清アルブミン溶液中において室温で 30 分間以上インキュベートすることによりブロッキングを行った。充分量の TBS-T (Tween 20含有TBS : 10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で10 分間、2 回以上洗浄後、TBS-T で50,000倍に希釈した抗リン酸化チロシン抗体 (4G10、
- 2 0
- 2 5 UBI社)、抗LAR E-サブユニット抗体または抗インスリンレセプター β 鎖抗体 (UBI社) を加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-Tで

- 5 分間、3 回以上洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG : Santa Cruz Biotechnology社製） 1.5 ml を含むTBS-T溶液を15 ml 加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-T で5 分間、3 回以上洗浄後、発光試薬セット（和光純薬工業株式会社製）を用いてケミルミネッセンス法により、各抗体と結合する蛋白質のバンドを検出した。

f. 結果

- 1 0 このように、LAR C/SとIR WTをCOS-7細胞にコトランスフェクションしインスリンで一定時間刺激した後に作製した細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行ったところ、インスリン刺激 1分でインスリンレセプターβ鎖のチロシンリン酸化および 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められた。これらのチロシンリン酸化は、インスリン刺激後 30分においても持続して認められた（第2図A参照）。
- 1 5 また、抗 LAR E-サブユニット抗体（第2図B）、抗インスリンレセプターβ鎖抗体（第2図C）および抗リン酸化チロシン抗体（第2図A）を用いたイムノブロッティングの結果、LARとインスリンレセプターがインスリンレセプターのチロシンリン酸化の有無により会合することも明らかとなった。

2 0

〔実験例2〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討（1）

- 次に、LAR WT、LAR C/SおよびLAR DC/Sと IR WTを用いて同様に COS-7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで 5分間刺激後、抗
- 2 5 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、沈降物について各種抗体を用いたイムノブロッティングを行った。その結果、インスリンレセプターと

LAR WTをコトランスフェクションしたものは LAR C/SやLAR DC/Sをコトランスフェクションしたものと比べると、インスリンレセプターβ鎖や85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化はほとんど検出されなかった（第3図A参照）。

- 5 また、この実験において LAR（第3図C）やインスリンレセプター（第3図D）の発現量は、それぞれのトランスフェクタントにおいてはほぼ同一であったことより、LAR WTはインスリンレセプターβ鎖や85 kDa蛋白質のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが示された。

- 10 また、抗 LAR E-サブユニット抗体による免疫沈降物を抗インスリンレセプターβ鎖抗体でイムノブロッティングしたところ、LAR DC/Sをコトランスフェクションしたものでは LAR WTや LAR C/Sをコトランスフェクションしたものに比較すると、インスリンレセプターβ鎖のバンドが明らかに弱かった（第3図B）。

- 15 この結果は、LAR WTや LAR C/Sに比べて、LAR DC/Sとインスリンレセプターの会合が弱いことを示すものである。LAR C/Sと LAR DC/Sの違いは、ホスファターゼドメイン 2の1813番目のアミノ酸のみであることから、チロシンホスファターゼ活性を示さず基質との結合に関与すると推測されてきたこのドメイン 2が、LARとインスリンレセプターとの結合に機能していることが明らかとなった。

20

〔実験例3〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討（2）

- 25 さらに、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化がLARに結合したもののみであるのか、またはインスリンレセプター全てで確認されるのかを検討するために、このコトランスフェクタントの細胞溶解液を電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った。そ

の結果、LAR WTを導入したもののみ、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化が顕著に認められた（第4図参照）。

〔実験例4〕LAR C/S存在下でのインスリンレセプターのチロシンリン酸化

5 化の検討

次に、85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化がインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性によるものであるかを明らかにするため、LAR C/SとIR WTまたはインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性を欠失させたIR K1018M（IR MT）をCOS-7細胞にコトランスフェクションした。5分間インスリン刺激を行った後、抗LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った（第5図参照）。その結果、IR WTとコトランスフェクションしたものではインスリン刺激によりインスリンレセプターβ鎖および85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められたが、IR K1018Mとコトランスフェクションしたものはこれらのリン酸化が全く認められなかった。

以上の結果より、インスリンがインスリンレセプターに結合するとインスリンレセプターのβ鎖の速やかなチロシンリン酸化が起こり、さらにインスリンレセプターチロシンキナーゼが85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

従って、この85 kDa蛋白質は、インスリンレセプターと結合していることが確認されたLARのP-サブユニットである可能性が考えられた。

〔実施例1〕LARのP-サブユニットの細胞内ドメインに対する抗体の作製

以下の手順に従って、LARの細胞内ドメインに対する抗体を作製した。

2 5 a. 免疫原の調製

免疫原として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-LAR融合蛋白質

- (GST-LAR) を用いることとした。LAR P-サブユニットの 細胞膜貫通部分の終点より細胞質側すべてにあたる 607 アミノ酸 に相当するcDNA (配列番号: 1、3467塩基対) をpGEX-2T ベクター (Pharmacia Biotech社製) のBamHI/EcoRIサイトに組み込んだ発現ベクターを用いて
- 5 常法に従い *E. coli* AD202 を形質転換した。この大腸菌を LB (Amp.+) 寒天培地 (アガー7.5 gを含む後述のLB (Amp.+) 培地) で一晩培養した後、シングルコロニーをLB (Amp.+) 培地 (トリプトン10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L、5 N NaOH 0.2 ml/L、アンピシリンを 50 μ g / ml含有) 50 ml に接種し、さらに一晩培養した。これをLB(Amp.
- 10 +) 培地 500 mlに接種し、37°C で 600 nm における吸光度が約 1.0 になるまで培養し、1 M IPTG (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド、和光純薬工業社製) 50 μ l を加え、25°C で一晩培養した。この培養物を 3,000 rpm、4°C で15 分間遠心分離し、沈澱した菌体を NETN (0.5 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM
- 15 NaCl) 50 ml に懸濁させた。その後、1 分間 超音波処理、氷上 1 分間の操作を 2 回繰り返し、14,000 rpm、4°C で20 分間遠心分離して上清を得た。この大腸菌溶解液 10 ml に グルタチオンセファロースビーズ懸濁液 (Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech社製) を NETNで3 回洗浄し、50%NETN懸濁液として調製) を 100 μ l 加え、室温
- 20 で 30 分間インキュベートした。得られた懸濁液を3,000 rpm、4°C で5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈澱したグルタチオンセファロースビーズをNETNで 2 回、PBSで 1 回 洗浄し、SDS sampleバッファー (125 mM Tris-HCl pH 6.8、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、5% 2-メルカプトエタノール) を100 μ l 加え、沸騰水中で10 分間加熱して
- 25 GST-LAR融合蛋白質を溶出した。ビーズを除いた溶出液を、Centricon-10 (アミコン社製) に移し、3,000 rpm、45分間、4°C で遠心濃縮した。

緩衝化を目的として1 ml のPBSを加え、ふたたび 3,000 rpm、45分間、4℃で遠心濃縮した。この緩衝化の操作をさらに 2 回繰り返して得られたものを、免疫用の抗原溶液とした。抗原蛋白質の精製および濃縮は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

- 5 一方、最終免疫では静脈内投与を行うため、上記とは異なる方法で抗原溶液を調製した。GST-LAR融合蛋白質を発現している前記大腸菌溶解液とグルタチオンセファロースビーズをインキュベートし、遠心分離後、沈殿したビーズを NETNで2回、PBSで3回洗浄した。次いで GSH 溶出バッファー (20 mM グルタチオン、1M Tris-HCl、pH 9.6) を100 μ l加え、
- 1 0 10分間室温で軽く攪拌して GST-LARを溶出させた。3,000 rpm、4℃ で5分間遠心分離して上清を回収する操作を計 3 回行い、全溶出液を生理食塩水中 4℃ で2日間透析したものを、静脈内投与用抗原溶液とした。

b. 免疫処置

- 6週齢の雌性 Balb/c マウス 8 匹に対し、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン、Sigma社製)を 0.5 ml/匹で腹腔内投与した。2
- 1 5 週間後、腹腔内免疫用抗原溶液をフロイント完全アジュバント (GIBCO社製) と 1 : 1 で混和しエマルジョン化したものを、GST-LAR融合蛋白質が約10 μ g/匹となるよう腹腔内投与した。以後、ほぼ2週間ごとに4回、腹腔内免疫用抗原溶液とフロイント不完全アジュバント (GIBCO社製) と
- 2 0 の 1 : 1 混和物をGST-LAR が約 30~70 μ g/匹となるよう調製し、腹腔内投与した。4 回目の免疫の4日後に眼底静脈より採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定した。

c. ELISA

- 2 5 静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製した GST-LAR および GSTのみの蛋白質溶液を、それぞれ精製水に対して 4℃ で一晩透析した。これを、PBS で 0.5 μ g / ml に調製し、50 μ l/ウェルで ELISAプレート

- (Falcon 3911 MicroTest · TM Flexible Assay Plate) に1時間吸着させた。洗浄用バッファー (0.05% Tween20 を含む PBS) で5回洗浄後、5%スキムミルク (2.5 gのスキムミルクを 50 ml の PBS に溶解して調製) でブロッキングを行った。これを洗浄後、bで得られた血清を血清
- 5 希釈用バッファー (0.25% BSA を含む PBS) で16,000倍に希釈し、50 μ l/ウェルずつ加え、湿箱中1時間インキュベートした。プレートを洗浄後、1000 倍希釈 HRP標識抗マウスIgG抗体を50 μ l/ウェルずつ加え1 時間インキュベートした。洗浄用バッファーで 4 回、PBS で1回 洗浄後、o-フェニレンジアミン (和光純薬工業社製) をクエン酸緩衝液
- 1 0 (5.6325 g クエン酸一水和物、18.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を精製水に溶解し、500 mlとして調製) に 1 mg /mlの濃度で溶解させた基質溶液を 50 μ l/ウェルとなるように加え、30 分間反応させた後、50 μ l の 10% H_2SO_4 を加え反応を停止した。このうち 50 μ l を測定用 96ウェルプレート (住友ベークライト社製) に移して450 nm の吸光度を測定した。

1 5 d. 細胞融合

上記ELISAの結果よりGST-LARに対する抗体価の上昇が認められたマウス2匹に静脈内投与により最終免疫を行い、その3日後に脾臓を摘出して常法により脾細胞を調製した。

- 細胞融合のためのparent cellは、事前に 20 μ g / mlの 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル
- 2 0 トランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株であることを確認したBalb/c マウス由来ミエローマ細胞株 NS1 を用いた。NS1細胞 2×10^7 細胞数と 脾細胞 1×10^5 細胞数に対し、ClonaCell (商標名) - HY Hybridoma Cloning Kit (StemCell Technologies Inc.) を用いて細胞融合、HAT
- 2 5 選択およびクローニングを行った。

クローニングされたハイブリドーマ培養上清のスクリーニングは、静

脈内免疫用抗原と同様の方法で調製したGST、GST-LARまたは GST-CD45

(Furukawa, T. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10928-

10932, 1994)) の蛋白質溶液0.5 μ g/mlを結合させたプレートにて、ハイブリドーマ培養上清50 μ lについて前記cにおける ELISA法に準じて行っ

- 5 た。このELISA法において、GSTまたはGST-CD45を結合させたウェルには免疫反応を示さず、GST-LARを結合させたウェルのみに免疫反応を示すハイブリドーマを選択した。なお、クローニングされたハイブリドーマの継代培養は、10% ウシ胎児血清 (GIBCO社製)を含有するRPMI 1640 培養液 (日水製薬社製)で行った。

- 1 0 このように、HAT選択されたハイブリドーマの培養上清を ELISA法によりスクリーニングすることによって、抗体産生能、増殖能とも安定し、LARの細胞内ドメインに特異性を有するクローンYU1が得られた。

このハイブリドーマ細胞YU1は、1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に

- 1 5 寄託し、その受託番号は、FERM BP-6343である。

e. モノクローナル抗体のタイピング

上記dで得られたハイブリドーマ細胞YU1の培養上清 0.5 ml を 4.5 ml の TBS-T で希釈し、希釈液のうち 3 mlについてMouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham International plc. 製) を用いて、

- 2 0 アイソタイプを調べた。その結果、抗体のアイソタイプは、IgG2b κ であった。

f. モノクローナル抗体の調製と精製

6 週齢の雌性 Balb/c マウスに対し、0.5 ml / 匹のプリスタンを腹腔内投与し、その10 日後に、上記dのクローニングで得られたハイブリド

- 2 5 マーマ細胞YU1を、1 匹あたり $2.5 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$ 細胞数/0.5 ml / 匹で腹腔内へ注入した。10日後ごろから、マウスの腹部肥大を認めたため

20ゲージの注射針を用いて数回にわたり腹水を採取した。採取した腹水は、1,000 rpm、4 °Cにて5 分間遠心分離し、上清と沈殿物とに分けた。上清は、37 °Cで30 分間処理した後、4 °Cに一晩静置した。12,000 rpm、4°Cにて10 分間遠心分離し、得られた上清 1.5 ml よりアフィニティーカラムHiTrap ProteinG (Pharmacia Biotech社製) を用いてモノクローナル抗体YU1を精製した。得られた抗体溶液の280 nm における吸光度を測定し、マウスIgG の分子吸光係数より抗体濃度を算出した。

さらに、このモノクローナル抗体YU1につき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の移動度から見かけの分子量を明らかにした。この結果を第6図に示す。第6図に明らかなように、モノクローナル抗体YU1は、約50 kDのH鎖と、約25 kDのL鎖を含み、約150 kDの分子量を有していた。

[実施例 2] モノクローナル抗体の特異性の検討

実験例 1、a および b に記載した手順に従って、LAR WTの発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションした。その細胞溶解液について、実施例 1 で得られた精製モノクローナル抗体を用いて免疫沈降後、イムノブロッティングを行った。免疫沈降での対照として、IgG1サブクラスに属する抗体 (抗LAR E-サブユニット抗体 (前記) および抗CD45抗体 (Santa Cruz Biotechnology社製、35-Z6)) に対してはMOPC 21を、モノクローナル抗体YU1に対しては マウスIgG2b κ (MOPC 195、CAPPEL社製) を用いた。

係るCOS-7細胞へのLAR強制発現系を用いた解析により、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、モノクローナル抗体YU1は、LAR P-サブユニットに相当する 85 kDaとブレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質を認識した (第7図B参照)。

さらに、LARをトランスフェクションした COS-7細胞の細胞抽出液をこれらの抗体 (IgG1、IgG2b、またはYU1) により免疫沈降後、LAR E-サブユニットを認識する抗体でイムノブロッティングを行ったところ、抗体 YU1で免疫沈降したもののみで、LAR E-サブユニットに相当する150 kDaと、プレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質が検出された (第7図 A)。以上の結果より、モノクローナル抗体YU1は、LARのP-サブユニットの免疫沈降およびイムノブロッティングに利用可能であることが明らかとなった。

1 0 【実施例3】インスリンレセプターチロシンキナーゼによる LARのリン酸化

実験例4によって、インスリンレセプターとLARのコトランスフェクションにより検出されるチロシンリン酸化された 85 kDaのバンドが LARのP-サブユニットである可能性が考えられた。

1 5 そこで実施例1にて作製したモノクローナル抗体YU1を用いて、インスリンレセプターチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化された85 kDaの蛋白質が LAR P-サブユニットであるかの検討を、実験例1に記載したと同様の手技に基づいて行った。

2 0 LAR WTまたはLAR C/Sと IRをコトランスフェクション後、インスリンで1分間刺激したCOS-7細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降した後、抗 LAR E-サブユニット抗体と抗体YU1との混合物でイムノブロッティングすると、LARのプレカーサーと各サブユニットが検出された。

2 5 このプロットをさらに抗リン酸化チロシン抗体でリブローブしたところ、85 kDaのチロシンリン酸化バンドが LAR P-サブユニットのバンドと一致した (第8図参照)。これらの結果は、LARがインスリンレセプター

の基質の一つであることを示すものである。

さらに、この LAR P-サブユニットのチロシンリン酸化は LAR WTとの
コトランスフェクタントで検出されなかったことから、LARは自己脱リン
酸化すると考えられた（第3図参照）。

- 5 第9図に示すように、インスリンがインスリンレセプター α 鎖に結合
すると、インスリンレセプターの β 鎖が自己リン酸化されチロシンキナ
ーゼ活性が上昇する。このチロシンキナーゼの働きにより、最終的にグ
ルコースの取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリン作用が発現
する。この活性化されたインスリンレセプターは、LARによってチロシン
10 脱リン酸化を受けて不活性化状態に戻ることが示された。

また、インスリンレセプターチロシンキナーゼは LARの細胞内ドメイ
ンをチロシンリン酸化することが明らかとなり、このリン酸化が LARの
基質特異性の決定か、ホスファターゼ活性の上昇に関与していることが
推測された。そしてLARは、このリン酸化チロシンを自己脱リン酸化する
15 ことによりその酵素活性を制御していると考えられる。

以上の結果より、LARの酵素活性の促進がインスリン抵抗性の原因とな
る可能性を分子レベルで示すことができた。

〔実施例4〕マウスでのLARの組織分布

- 20 7週齢雄性C57BL/6マウスから摘出した各臓器1gに対し、冷細胞溶解用
バッファー（実験例1、c欄に記載したものに同じ）3 ml を加え、氷
上でホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4°C、
15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上
清をそれぞれの組織試料として用いた。タンパク定量はDC Protein Ass
25 ay（バイオラッド）のマニュアルに従って行った。

得られた各上清（タンパク質0.2 mgに相当）を電気泳動後、YU1を用

い、実験例 1、e 欄に記載した方法に従って、イムノブロットを行った。

得られた結果を図 1 4 に示す。YU1 はマウスの LAR も認識することができ、胸腺および脳での LAR の発現を確認することができた。腎臓および肝臓でも若干の発現が認められた。

[実施例 5] YU1 による甲状腺癌組織切片の免疫染色

甲状腺の組織を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後パラフィンブロックを作製し、スライド標本を作製した。以下にその詳細な手順を示す。

1. 脱パラフィン操作

固定したパラフィンブロックを 100% キシレンに 5 分間 × 2 回浸し、その後 100% エタノール、90% エタノール、70% エタノールにそれぞれ 3 分間浸した。最後に 10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸した。この状態で抗原決定基を露出させるために、100°C、5 分間オートクレーブにかけた。

2. 免疫染色

0.15M NaCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) (トリス液) で洗浄し、さらにこのトリス液に浸した。その後、内因性ペルオキシダーゼの除去を目的に、液をスライドガラスから拭い取り 3% 過酸化水素水を組織の上に滴下し、3 分間放置した。

ブロッキングは、水で十分に洗浄後、さらにトリス液で十分に洗浄し余分な液を拭い取った後、キャリアタンパク (2% BSA) と 0.015M アジ化ナトリウムおよび 0.15M NaCl を含んだ 50mM Tris-HCl 緩衝液

(pH 7.6) 液で組織を覆い 15 分間放置することにより行った。

次いで、洗浄しないで余分な液を拭い取り、一次抗体 YU1

(原液を1000倍希釈)を滴下後、そのまま湿潤箱の中で90分間放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄した後、二次抗体 (ビオチン化抗マウスイムノグロブリン) を滴下し
5 45分放置した。

その後、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄し、ストレプトアビジン接合セイヨウワサビペルオキシダーゼを滴下後、25分放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄後、0.02% 過酸化水素および0.15M NaCl を含む0.05%DAB (3,3'-ジミ
10 ノベンチジン四塩酸)の50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) を滴下し、顕微鏡下で発色を確認し、水の中にスライドガラスを浸すことによって反応を停止させた。

反応停止後、マイヤーのヘマトキシリンに5-10秒間浸し、後染色を行
15 った。その後、水洗し、100%エタノールに1分間×2回、100%キシレンに1分間×2回浸した後、マリノールで封入し、観察した。

尚、ブロッキング、二次抗体、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ溶液はDAKO Japan Co. Ltd., (Kyoto)のLSAB キットを用い、DABはDojindo (Kumamoto)の試薬を、MalinolはMuto Pure Chemicals Ltd.,
20 (Tokyo)を、マイヤーのヘマトキシリンは自作のものを使用した。

こうして得られた甲状腺癌細胞の免疫染色の結果を図11～13に示す。これらの図から、癌化した甲状腺組織細胞にYU1抗体が選択的に結合し (褐色染色部)、正常の濾胞細胞および腫瘍組織の間質には結合しない (青色染色部) ことが判る。

25 従って、この抗体を用いて甲状腺癌の組織切片染色による診断が可能であること、さらにはこの抗体が抗癌剤 (化学療法剤) を含むDDSシステ

ムにおいて有用であることも明らかになった。

[実施例 6] 他の良性腫瘍細胞および癌細胞組織の免疫染色

実施例 5 に記載したと同様の手順により、以下の表 1 に示す種々の良性腫瘍細胞および癌化細胞組織（ヒト由来）の免疫染色を実施した。

YU1 抗体との結合性に基づく染色が認められたものを陽性として、その割合を以下の表 1 に示す。

表 1

腫瘍		症例	陽性例数	陽性率
良 性	髄膜腫	10	0	0
	グリオーマ	13	1	7.7
	甲状腺腺腫	10	0	0
悪 性	甲状腺癌	21	21	100
	胃癌	16	1	6.3
	大腸癌	26	13	50
	肺癌	20	2	10
	乳癌	20	3	15
	肝癌	8	0	0
	腎癌	21	0	0
	前立腺癌	32	2	6.3

この結果、甲状腺癌での陽性率は100%であり、良性腫瘍やその他の臓器の癌では陽性率が低いか、または完全に陰性であることが明らかになった。大腸癌で比較的高い陽性率が示されているがここで認められた陽性染色像は、甲状腺癌におけるものと随分異なっており、顕著な染色が認められた甲状腺癌細胞に対するYU1の特異的免疫反応性が示唆された。

〔実施例7〕 YU1による甲状腺癌の特異的免疫反応：イムノアッセイ利用可能性の検討

10 実施例5で使用したヒト甲状腺癌組織および正常組織各1gに対し、冷細胞溶解用バッファー（同上） 3ml を加え、氷上でポリトロンを用いてホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4℃、15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上清を用いた。タンパク定量はDC Protein Assay（バイオラッド）のマニュアル

15 に従って行った。

得られた上清（タンパク質1 mgに相当）、あるいは 陽性対照として、COS-7細胞にヒトLARをトランスフェクトし、抗LAR抗体を用いて免疫沈降したもの（実験例1 a～cに記載の手順に従って、調製）を電気泳動後、実験例1、e欄に記載した方法に従ってYU1を用いてイムノブロットを行った。検出にはImmunoStar Reagents（和光純薬工業）を用いた。

こうして得られた結果を図14に示す。図14に示されるとおり、YU1は正常の甲状腺細胞と異なり、癌化した甲状腺組織を特異的に認識することが明らかになった。従って、甲状腺の吸引バイオブシーによって得られる組織試料を甲状腺癌の診断に利用できることが判った。

25

〔産業上の利用可能性〕

- 本発明によって提供される、LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体は、ホスファターゼ活性を有するLARの細胞内ドメインを特異的に認識することができる。従って、この抗体は、インスリンのシグナル伝達機構を解明したり、LARのモジュレーターや結合タンパク質等を同定、
- 5 取得するために極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

- さらに本発明の抗体は、甲状腺癌に対する特異的免疫反応性を有する
- 10 ので、吸引バイオプシーや組織切片を用いた甲状腺癌の診断、甲状腺癌治療のためのDDSを利用した医薬組成物などに有用であり、また、甲状腺癌細胞におけるLAR分子の転写、翻訳レベルでの発現調節因子の分子生物学的研究にも貢献することができる。

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Antibody Specific for Phosphatase Subunit of LAR

<130> 99P133W0

<160> 3

<210> 1

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (6).. (1826)

<220>

<221> misc_feature

<222> (213).. (953)

<223> Phosphatase Domain 1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1080).. (1826)

<223> Phosphatase Domain 2

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. Y00815

<309> 1995-09-19

<400> 1

gatcc gga ctg aag gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag	50
Gly Leu Lys Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu	
1 5 10 15	
atg cgg agg ctc aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc	98
Met Arg Arg Leu Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro	
20 25 30	
atc ccc atc acc gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac	146
Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn	
35 40 45	
gat ggc ctc aag ttc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct gga cag	194
Asp Gly Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln	
50 55 60	
cag ttc acg tgg gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac	242
Gln Phe Thr Trp Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn	
65 70 75	
cgc tat gcg aat gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc	290
Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr	
80 85 90 95	

tct atc gat ggc gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc	338
Ser Ile Asp Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile	
100 105 110	
gat ggc tac cgc aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg	386
Asp Gly Tyr Arg Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu	
115 120 125	
ccc gag acc atg ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg	434
Pro Glu Thr Met Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr	
130 135 140	
gcc act gtg gtc atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa	482
Ala Thr Val Val Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys	
145 150 155	
tgt gat cag tac tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att	530
Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile	
160 165 170 175	
cag gtg acc ctg ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc	578
Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg	
180 185 190	
acc ttc gca ctc cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt	626
Thr Phe Ala Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg	
195 200 205	
cag ttt cag ttc atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca	674
Gln Phe Gln Phe Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro	
210 215 220	

act ccc atc ctg gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta	722
Thr Pro Ile Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu	
225 230 235	
gac gca ggg ccc atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc	770
Asp Ala Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr	
240 245 250 255	
ggc tgc ttc atc gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag	818
Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu	
260 265 270	
aag acg gtg gac atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg	866
Lys Thr Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg	
275 280 285	
aac tac atg gtg cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg	914
Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala	
290 295 300	
ctg ctg gag gct gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac	962
Leu Leu Glu Ala Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn	
305 310 315	
ctg tat gcc cac atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt	1010
Leu Tyr Ala His Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser	
320 325 330 335	
gtg acc gcc atg gag ctc gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc	1058
Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala	
340 345 350	

cac acg tcc cgc ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag	1106
His Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys	
355 360 365	
aac cgg ctg gtg aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg	1154
Asn Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu	
370 375 380	
cag ccc atc cgt ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc	1202
Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe	
385 390 395	
ctg gat ggt tat aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct	1250
Leu Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro	
400 405 410 415	
ctg gca gag agc acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat	1298
Leu Ala Glu Ser Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn	
420 425 430	
tcc acc atc atc gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag	1346
Ser Thr Ile Ile Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu	
435 440 445	
aaa tgc cac cag tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac	1394
Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr	
450 455 460	
ttt gtt gtt gac ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg	1442
Phe Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu	
465 470 475	

cgt gag ttc aag gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc	1490
Arg Glu Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile	
480 485 490 495	
cgg cag ttc cag ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca	1538
Arg Gln Phe Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr	
500 505 510	
ggc gag gga ttc att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag	1586
Gly Gly Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu	
515 520 525	
cag ttt gga cag gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg	1634
Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val	
530 535 540	
ggc cgc acc ggg gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg	1682
Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met	
545 550 555	
cgc tat gag ggc gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt	1730
Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg	
560 565 570 575	
aca cag cgt cct gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc	1778
Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys	
580 585 590	
tac cgt gcg gcc ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg	1826
Tyr Arg Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr	
595 600 605	
taactacegc tccccctctcc tccgccaccc ccgccgtggg gctccggagg ggaccagct	1886
cctctgagcc ataccgacca tcgtccagcc ctctacgca gatgctgtca ctggcagagc	1946

acagcccacg gggatcacag cgtttcagga acgttggccac accaatcaga gagcctagaa 2006
 catccctggg caagtggatg gccagcagg caggcactgt ggcccttcig tccaccagac 2066
 ccacctggag cccgcttcaa gctctcigt gcgctcccgc atttctcatg cttcttctca 2126
 tggggtaggg ttggggcaaa gcctccttt taatacattt agtggggtag actgagggat 2186
 tttagcctct tccctctgat ttttccttc gcgaatccgt atctgcagaa tgggccactg 2246
 taggggttgg ggtttatatt gttttgttt ttttttttt ttgtatgact tctgtgaag 2306
 gacagaacat tgccttcctc gtgcagagct ggggctgcc a gctgagcgg aggctcggcc 2366
 gtgggcccgg aggcagtgt gatccggctg ctcctccagc cttcagacg agatcctgtt 2426
 tcagctaaat gcagggaac tcaatgttt ttttaagttt gtttccctt taaagccttt 2486
 ttttaggcca cattgacagt ggtgggcccg gagaagatag ggaacactca tccctggctg 2546
 tctatcccag tgtgtgttta acattcacag cccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc 2606
 tggcaaggca ttcctcatca ccatcgtgt tgcaaagggt aaaacaaaaa caaaaaacca 2666
 caaaaaataaa aaacaaaaaa aacaaaaaac ccaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct 2726
 tggtctctgc ttcaaaccct caagagggga agcaactccg tgtgcctggg gttcccgagg 2786
 gagctgctgg ctgacctggg cccacagagc ctggctttgg tcccagcat tgcagtatgg 2846
 tgtggtgttt gtaggctgtg gggctctggct gtgtggccaa ggtgaatagc acaggttagg 2906
 gtgtgtgcca caccctatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc ctttcaggtc 2966
 caggccagtg ggcttggtag cacatgtctg tctcagagc aggggccaga tgattttcct 3026
 ccttggtttg cagctgtttt caaagcccc gataatcgt cttttccact ccaagatgcc 3086
 ctcataaacc aatgtggcaa gactactgga cttctatcaa tggctactta atcagtcctt 3146
 attatcccag cttgtgagg ggcagggaga gcgctcttc ctttgggcag cgctatctag 3206
 ataggtaagt gggggcgggg aagggtgcat agctgtttta gctgaggggac gtggtgccga 3266
 cgtcccaaaa cctagctagg ctaagtcaag atcaacattc cagggttggg aatgttggat 3326
 gatgaaacat tcatttttac cttgtggatg ctagtgtgt agagttcact gtgttacaca 3386
 gtctgttttc tatttgtaa gaaaaactac agcatcattg cataattctt gatggtaata 3446
 aatttgaata atcagatttc t

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Signature Motif Conserved in Phosphatase Domain of Known
PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (1)

<223> "Xaa"="Ile" or "Val".

<220>

<221> UNSURE

<222> (10)

<223> "Xaa"="Ser" or "Thr".

-----<400> 2-----

Xaa His Cys Xaa Ala Gly Xaa Xaa Arg Xaa Gly

1

5

10

<210> 3

<211> 7702

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (371).. (6064)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (371).. (418)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (419).. (6061)

<220>

<221> misc_feature

<222> (419).. (4120)

<223> Extracellular Domain

<220>

<221> misc_feature

<222> (4121).. (4192)

<223> Transmembrane Domain

<220>

<221> misc_feature

<222> (4193).. (6061)

<223> Cytoplasmic Domain

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. Y00815

<309> 1995-09-19

<400> 3

cgggagcggc gggagcggg gcggcgccag aggcggcggc tccagcttcg gctccggctc 60
 gggctcgggc tccggctccg gctccggctc cggtccagc tcgggtggcg gtggcgggag 120
 cgggaccagg tggaggcggc ggccggcagag gagggggagc agcggcccta gcggcttgcg 180
 gggggacatg cggaccgacg gcccctggat aggcggaagg agtggaggcc ctggtgcccc 240
 gcccttggtg ctgagtatcc agcaagagt accgggggtga agaagcaaag actcggttga 300
 ttgtcctggg ctgtggctgg ctgtggagct agagccctgg atggccctg agccagcccc 360
 agggaggacg atg gtg ccc ctt gtg cct gca ctg gtg atg ctt ggt ttg 409

Met Val Pro Leu Val Pro Ala Leu Val Met Leu Gly Leu

-15

-10

-5

gtg gca ggc gcc cat ggt gac agc aaa cct gtc ttc att aaa gtc cct 457
 Val Ala Gly Ala His Gly Asp Ser Lys Pro Val Phe Ile Lys Val Pro

1

5

10

gag gac cag act ggg ctg tca gga ggg gta gcc tcc ttc gtg tgc caa 505
 Glu Asp Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Gln

15

20

25

gct aca gga gaa ccc aag ccg cgc atc aca tgg atg aag aag ggg aag 553
 Ala Thr Gly Glu Pro Lys Pro Arg Ile Thr Trp Met Lys Lys Gly Lys

30

35

40

45

aaa gtc agc tcc cag cgc ttc gag gtc att gag ttt gat gat ggg gca	601
Lys Val Ser Ser Gln Arg Phe Glu Val Ile Glu Phe Asp Asp Gly Ala	
50 55 60	
ggg tca gtg ctt cgg atc cag cca ttg cgg gtg cag cga gat gaa gcc	649
Gly Ser Val Leu Arg Ile Gln Pro Leu Arg Val Gln Arg Asp Glu Ala	
65 70 75	
atc tat gag tgt aca gct act aac agc ctg ggt gag atc aac act agt	697
Ile Tyr Glu Cys Thr Ala Thr Asn Ser Leu Gly Glu Ile Asn Thr Ser	
80 85 90	
gcc aag ctc tca gtg ctc gaa gag gaa cag ctg ccc cct ggg ttc cct	745
Ala Lys Leu Ser Val Leu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Pro Gly Phe Pro	
95 100 105	
tcc atc gac atg ggg cct cag ctg aag gtg gtg gag aag gca cgc aca	793
Ser Ile Asp Met Gly Pro Gln Leu Lys Val Val Glu Lys Ala Arg Thr	
110 115 120 125	
gcc acc atg cta tgt gcc gca ggc gga aat cca gac cct gag att tct	841
Ala Thr Met Leu Cys Ala Ala Gly Gly Asn Pro Asp Pro Glu Ile Ser	
130 135 140	
tgg ttc aag gac ttc ctt cct gta gac cct gcc acg agc aac ggc cgc	889
Trp Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp Pro Ala Thr Ser Asn Gly Arg	
145 150 155	
atc aag cag ctg cgt tca ggt gcc ttg cag ata gag agc agt gag gaa	937
Ile Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu	
160 165 170	

tcc gac caa ggc aag tac gag tgt gtg ggc acc aac tcg gca ggc aca	985
Ser Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly Thr	
175 180 185	
cgt tac tca gcc cct gcg aac ctg tat gtg cga gtg cgc cgc gtg gct	1033
Arg Tyr Ser Ala Pro Ala Asn Leu Tyr Val Arg Val Arg Arg Val Ala	
190 195 200 205	
cct cgt ttc tcc atc cct ccc agc agc cag gag gtg atg cca ggc ggc	1081
Pro Arg Phe Ser Ile Pro Pro Ser Ser Gln Glu Val Met Pro Gly Gly	
210 215 220	
agc gtg aac ctg aca tgc gtg gca gtg ggt gca ccc atg ccc tac gtg	1129
Ser Val Asn Leu Thr Cys Val Ala Val Gly Ala Pro Met Pro Tyr Val	
225 230 235	
aag tgg atg atg ggg gcc gag gag ctc acc aag gag gat gag atg cca	1177
Lys Trp Met Met Gly Ala Glu Glu Leu Thr Lys Glu Asp Glu Met Pro	
240 245 250	
gtt ggc cgc aac gtc ctg gag ctc agc aat gtc gta cgc tct gcc aac	1225
Val Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Ser Asn Val Val Arg Ser Ala Asn	
255 260 265	
tac acc tgt gtg gcc atc tcc tcg ctg ggc atg atc gag gcc aca gcc	1273
Tyr Thr Cys Val Ala Ile Ser Ser Leu Gly Met Ile Glu Ala Thr Ala	
270 275 280 285	
cag gtc aca gtg aaa gct ctt cca aag cct ccg att gat ctt gtg gtg	1321
Gln Val Thr Val Lys Ala Leu Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val	
290 295 300	

aca gag aca act gcc acc agt gtc acc ctc acc tgg gac tct ggg aac 1369
 Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn

305

310

315

tcg gag cct gta acc tac tat ggc atc cag tac cgc gca gcg ggc acg 1417
 Ser Glu Pro Val Thr Tyr Tyr Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr

320

325

330

gag ggc ccc ttt cag gag gtg gat ggt gtg gcc acc acc cgc tac agc 1465
 Glu Gly Pro Phe Gln Glu Val Asp Gly Val Ala Thr Thr Arg Tyr Ser

335

340

345

att ggc ggc ctc agc cct ttc tcg gaa tat gcc ttc cgc gtg ctg gcg 1513
 Ile Gly Gly Leu Ser Pro Phe Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala

350

355

360

365

gtg aac agc atc ggg cga ggg ccg ccc agc gag gca gtg cgg gca cgc 1561
 Val Asn Ser Ile Gly Arg Gly Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg

370

375

380

acg gga gaa cag gcg ccc tcc agc cca ccg cgc cgc gtg cag gca cgc 1609
 Thr Gly Glu Gln Ala Pro Ser Ser Pro Pro Arg Arg Val Gln Ala Arg

385

390

395

atg ctg agc gcc agc acc atg ctg gtg cag tgg gag cct ccc gag gag 1657
 Met Leu Ser Ala Ser Thr Met Leu Val Gln Trp Glu Pro Pro Glu Glu

400

405

410

ccc aac ggc ctg gtg cgg gga tac cgc gtc tac tat act ccg gac tcc 1705
 Pro Asn Gly Leu Val Arg Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr Thr Pro Asp Ser

415

420

425

cgc cgc ccc ccg aac gcc tgg cac aag cac aac acc gac gcg ggg ctc 1753

Arg Arg Pro Pro Asn Ala Trp His Lys His Asn Thr Asp Ala Gly Leu

430 435 440 445

ctc acg acc gtg ggc agc ctg ctg cct ggc atc acc tac agc ctg cgc 1801

Leu Thr Thr Val Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Tyr Ser Leu Arg

450 455 460

gtg ctt gcc ttc acc gcc gtg ggc gat ggc cct ccc agc ccc acc atc 1849

Val Leu Ala Phe Thr Ala Val Gly Asp Gly Pro Pro Ser Pro Thr Ile

465 470 475

cag gtc aag acg cag cag gga gtg cct gcc cag ccc gcg gac ttc cag 1897

Gln Val Lys Thr Gln Gln Gly Val Pro Ala Gln Pro Ala Asp Phe Gln

480 485 490

gcc gag gtg gag tcg gac acc agg atc cag ctc tcg tgg ctg ctg ccc 1945

Ala Glu Val Glu Ser Asp Thr Arg Ile Gln Leu Ser Trp Leu Leu Pro

495 500 505

cct cag gag cgg atc atc atg tat gaa ctg gtg tac tgg gcg gca gag 1993

Pro Gln Glu Arg Ile Ile Met Tyr Glu Leu Val Tyr Trp Ala Ala Glu

510 515 520 525

gac gaa gac caa cag cac aag gtc acc ttc gac cca acc tcc tcc tac 2041

Asp Glu Asp Gln Gln His Lys Val Thr Phe Asp Pro Thr Ser Ser Tyr

530 535 540

aca cta gag gac ctg aag cct gac aca ctc tac cgc ttc cag ctg gct 2089

Thr Leu Glu Asp Leu Lys Pro Asp Thr Leu Tyr Arg Phe Gln Leu Ala

545 550 555

gca cgc tcg gat atg ggg gtg ggc gtc ttc acc ccc acc att gag gcc	2137
Ala Arg Ser Asp Met Gly Val Gly Val Phe Thr Pro Thr Ile Glu Ala	
560 565 570	
cgc aca gcc cag tcc acc ccc tcc gcc cct ccc cag aag gtg atg tgt	2185
Arg Thr Ala Gln Ser Thr Pro Ser Ala Pro Pro Gln Lys Val Met Cys	
575 580 585	
gtg agc atg ggc tcc acc acg gtc cgg gta agt tgg gtc ccg ccg cct	2233
Val Ser Met Gly Ser Thr Thr Val Arg Val Ser Trp Val Pro Pro Pro	
590 595 600 605	
gcc gac agc cgc aac ggc gtt atc acc cag tac tcc gtg gcc cac gag	2281
Ala Asp Ser Arg Asn Gly Val Ile Thr Gln Tyr Ser Val Ala His Glu	
610 615 620	
gcg gtg gac ggc gag gac cgc ggg cgg cat gtg gtg gat ggc atc agc	2329
Ala Val Asp Gly Glu Asp Arg Gly Arg His Val Val Asp Gly Ile Ser	
625 630 635	
cgt gag cac tcc agc tgg gac ctg gtg ggc ctg gag aag tgg acg gag	2377
Arg Glu His Ser Ser Trp Asp Leu Val Gly Leu Glu Lys Trp Thr Glu	
640 645 650	
tac cgg gtg tgg gtg cgg gca cac aca gac gtg ggc ccc ggc ccc gag	2425
Tyr Arg Val Trp Val Arg Ala His Thr Asp Val Gly Pro Gly Pro Glu	
655 660 665	
agc agc ccg gtg ctg gtg cgc acc gat gag gac gtg ccc agc ggg cct	2473
Ser Ser Pro Val Leu Val Arg Thr Asp Glu Asp Val Pro Ser Gly Pro	
670 675 680 685	

ccg cgg aag gtg gag gtg gag cca ctg aac tcc act gct gtg cat gtc	2521
Pro Arg Lys Val Glu Val Glu Pro Leu Asn Ser Thr Ala Val His Val	
690 695 700	
tac tgg aag ctg cct gtc ccc agc aag cag cat ggc cag atc cgc ggc	2569
Tyr Trp Lys Leu Pro Val Pro Ser Lys Gln His Gly Gln Ile Arg Gly	
705 710 715	
tac cag gtc acc tac gtg cgg ctg gag aat ggc gag ccc cgt gga ctc	2617
Tyr Gln Val Thr Tyr Val Arg Leu Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Leu	
720 725 730	
ccc atc atc caa gac gtc atg cta gcc gag gcc cag tgg cgg cca gag	2665
Pro Ile Ile Gln Asp Val Met Leu Ala Glu Ala Gln Trp Arg Pro Glu	
735 740 745	
gag tcc gag gac tat gaa acc act atc agc ggc ctg acc ccg gag acc	2713
Glu Ser Glu Asp Tyr Glu Thr Thr Ile Ser Gly Leu Thr Pro Glu Thr	
750 755 760 765	
acc tac tcc gtt act gtt gct gcc tat acc acc aag ggg gat ggt gcc	2761
Thr Tyr Ser Val Thr Val Ala Ala Tyr Thr Thr Lys Gly Asp Gly Ala	
770 775 780	
cgc agc aag ccc aaa att gtc act aca aca ggt gca gtc cca ggc cgg	2809
Arg Ser Lys Pro Lys Ile Val Thr Thr Thr Gly Ala Val Pro Gly Arg	
785 790 795	
ccc acc atg atg atc agc acc acg gcc atg aac act gcg ctg ctc cag	2857
Pro Thr Met Met Ile Ser Thr Thr Ala Met Asn Thr Ala Leu Leu Gln	
800 805 810	

tgg cac cca ccc aag gaa ctg cct ggc gag ctg ctg ggc tac cgg ctg	2905
Trp His Pro Pro Lys Glu Leu Pro Gly Glu Leu Leu Gly Tyr Arg Leu	
815 820 825	
cag tac tgc cgg gcc gac gag gcg cgg ccc aac acc ata gat ttc ggc	2953
Gln Tyr Cys Arg Ala Asp Glu Ala Arg Pro Asn Thr Ile Asp Phe Gly	
830 835 840 845	
aag gat gac cag cac ttc aca gtc acc ggc ctg cac aag ggg acc acc	3001
Lys Asp Asp Gln His Phe Thr Val Thr Gly Leu His Lys Gly Thr Thr	
850 855 860	
tac atc ttc cgg ctt gct gcc aag aac cgg gct ggc ttg ggt gag gag	3049
Tyr Ile Phe Arg Leu Ala Ala Lys Asn Arg Ala Gly Leu Gly Glu Glu	
865 870 875	
ttc gag aag gag atc agg acc ccc gag gac ctg ccc agc ggc ttc ccc	3097
Phe Glu Lys Glu Ile Arg Thr Pro Glu Asp Leu Pro Ser Gly Phe Pro	
880 885 890	
caa aac ctg cat gtg aca gga ctg acc acg tct acc aca gaa ctg gcc	3145
Gln Asn Leu His Val Thr Gly Leu Thr Thr Ser Thr Thr Glu Leu Ala	
895 900 905	
tgg gac ccg cca gtg ctg gcg gag agg aac ggg cgc atc atc agc tac	3193
Trp Asp Pro Pro Val Leu Ala Glu Arg Asn Gly Arg Ile Ile Ser Tyr	
910 915 920 925	
acc gtg gtg ttc cga gac atc aac agc caa cag gag ctg cag aac atc	3241
Thr Val Val Phe Arg Asp Ile Asn Ser Gln Gln Glu Leu Gln Asn Ile	
930 935 940	

acg aca gac acc cgc ttt acc ctt act ggc ctc aag cca gac acc act 3289

Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr

945

950

955

tac gac atc aag gtc cgc gca tgg acc agc aaa ggc tct ggc cca ctc 3337

Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp Thr Ser Lys Gly Ser Gly Pro Leu

960

965

970

agc ccc agc atc cag tcc cgg acc atg ccg gtg gag caa gtg ttt gcc 3385

Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr Met Pro Val Glu Gln Val Phe Ala

975

980

985

aag aac ttc cgg gtg gcg gct gca atg aag acg tct gtg ctg ctc agc 3433

Lys Asn Phe Arg Val Ala Ala Ala Met Lys Thr Ser Val Leu Leu Ser

990

995

1000

1005

tgg gag gtt ccc gac tcc tat aag tca gct gtg ccc ttt aag att ctg 3481

Trp Glu Val Pro Asp Ser Tyr Lys Ser Ala Val Pro Phe Lys Ile Leu

1010

1015

1020

tac aat ggg cag agt gtg gag gtg gac ggg cac tcg atg cgg aag ctg 3529

Tyr Asn Gly Gln Ser Val Glu Val Asp Gly His Ser Met Arg Lys Leu

1025

1030

1035

atc gca gac ctg cag ccc aac aca gag tac tcg ttt gtg ctg atg aac 3577

Ile Ala Asp Leu Gln Pro Asn Thr Glu Tyr Ser Phe Val Leu Met Asn

1040

1045

1050

cgt ggc agc agc gca ggg ggc ctg cag cac ctg gtg tcc atc cgc aca 3625

Arg Gly Ser Ser Ala Gly Gly Leu Gln His Leu Val Ser Ile Arg Thr

1055

1060

1065

gcc ccc gac ctc ctg cct cac aag ccg ctg cct gcc tct gcc tac ata 3673
 Ala Pro Asp Leu Leu Pro His Lys Pro Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile
 1070 1075 1080 1085
 gag gac ggc cgc ttc gat ctc tcc atg ccc cat gtg caa gac ccc tcg 3721
 Glu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Ser Met Pro His Val Gln Asp Pro Ser
 1090 1095 1100
 ctt gtc agg tgg ttc tac att gtt gtg gta ccc att gac cgt gtg ggc 3769
 Leu Val Arg Trp Phe Tyr Ile Val Val Val Pro Ile Asp Arg Val Gly
 1105 1110 1115
 ggg agc atg ctg acg cca agg tgg agc aca ccc gag gaa ctg gag ctg 3817
 Gly Ser Met Leu Thr Pro Arg Trp Ser Thr Pro Glu Glu Leu Glu Leu
 1120 1125 1130
 gac gag ctt cta gaa gcc atc gag caa ggc gga gag gag cag cgg cgg 3865
 Asp Glu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Gly Gly Glu Glu Gln Arg Arg
 1135 1140 1145
 cgg cgg cgg cag gca gaa cgt ctg aag cca tat gtg gct gct caa ctg 3913
 Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Leu Lys Pro Tyr Val Ala Ala Gln Leu
 1150 1155 1160 1165
 gat gtg ctc ccg gag acc ttt acc ttg ggg gac aag aag aac tac cgg 3961
 Asp Val Leu Pro Glu Thr Phe Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asn Tyr Arg
 1170 1175 1180
 ggc ttc tac aac cgg ccc ctg tct ccg gac ttg agc tac cag tgc ttt 4009
 Gly Phe Tyr Asn Arg Pro Leu Ser Pro Asp Leu Ser Tyr Gln Cys Phe
 1185 1190 1195

gtg ctt gcc tcc ttg aag gaa ccc atg gac cag aag cgc tat gcc tcc	4057
Val Leu Ala Ser Leu Lys Glu Pro Met Asp Gln Lys Arg Tyr Ala Ser	
1200 1205 1210	
agc ccc tac tgc gat gag atc gtg gtc cag gtg aca cca gcc cag cag	4105
Ser Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Val Val Gln Val Thr Pro Ala Gln Gln	
1215 1220 1225	
cag gag gag ccg gag atg ctg tgg gtg acg ggt ccc gtg ctg gca gtc	4153
Gln Glu Glu Pro Glu Met Leu Trp Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Val	
1230 1235 1240 1245	
atc ctc atc atc ctc att gtc atc gcc atc ctc ttg ttc aaa agg aaa	4201
Ile Leu Ile Ile Leu Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Phe Lys Arg Lys	
1250 1255 1260	
agg acc cac tct ccg tcc tct aag gat gag cag tgc atc gga ctg aag	4249
Arg Thr His Ser Pro Ser Ser Lys Asp Glu Gln Ser Ile Gly Leu Lys	
1265 1270 1275	
gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag atg cgg agg ctc	4297
Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu Met Arg Arg Leu	
1280 1285 1290	
aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc atc ccc atc acc	4345
Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro Ile Pro Ile Thr	
1295 1300 1305	
gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac gat ggc ctc aag	4393
Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys	
1310 1315 1320 1325	

ttc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct gga cag cag ttc acg tgg	4441
Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln Gln Phe Thr Trp	
1330	1335
1340	
gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac cgc tat gcg aat	4489
Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn Arg Tyr Ala Asn	
1345	1350
1355	
gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc tct atc gat ggc	4537
Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr Ser Ile Asp Gly	
1360	1365
1370	
gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc gat ggc tac cgc	4585
Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr Arg	
1375	1380
1385	
aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg ccc gag acc atg	4633
Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Met	
1390	1395
1400	1405
ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg gcc act gtg gtc	4681
Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Val Val	
1410	1415
1420	
atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa tgt gat cag tac	4729
Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys Cys Asp Gln Tyr	
1425	1430
1435	
tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att cag gtg acc ctg	4777
Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile Gln Val Thr Leu	
1440	1445
1450	

ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc acc ttc gca ctc	4825
Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg Thr Phe Ala Leu	
1455 1460 1465	
cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt cag ttt cag ttc	4873
His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg Gln Phe Gln Phe	
1470 1475 1480 1485	
atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca act ccc atc ctg	4921
Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro Ile Leu	
1490 1495 1500	
gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta gac gca ggg ccc	4969
Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu Asp Ala Gly Pro	
1505 1510 1515	
atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc ggc tgc ttc atc	5017
Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile	
1520 1525 1530	
gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag aag acg gtg gac	5065
Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu Lys Thr Val Asp	
1535 1540 1545	
atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg aac tac atg gtg	5113
Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Met Val	
1550 1555 1560 1565	
cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg ctg ctg gag gct	5161
Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala Leu Leu Glu Ala	
1570 1575 1580	

gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac ctg tat gcc cac	5209
Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn Leu Tyr Ala His	
1585	1590
atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt gtg acc gcc atg	5257
Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser Val Thr Ala Met	
1600	1605
gag ctc gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc cac acg tcc cgc	5305
Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala His Thr Ser Arg	
1615	1620
ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag aac cgg ctg gtg	5353
Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val	
1630	1635
aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg cag ccc atc cgt	5401
Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg	
1650	1655
ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc ctg gat ggt tat	5449
Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Tyr	
1665	1670
aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct ctg gca gag agc	5497
Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Ser	
1680	1685
acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat tcc acc atc atc	5545
Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser Thr Ile Ile	
1695	1700
	1705

gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag aaa tgc cac cag 5593
 Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln
 1710 1715 1720 1725
 tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac ttt gtt gtt gac 5641
 Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val Asp
 1730 1735 1740
 ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg cgt gag ttc aag 5689
 Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Arg Glu Phe Lys
 1745 1750 1755
 gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc cgg cag ttc cag 5737
 Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile Arg Gln Phe Gln
 1760 1765 1770
 ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca ggc gag gga ttc 5785
 Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr Gly Glu Gly Phe
 1775 1780 1785
 att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag cag ttt gga cag 5833
 Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly Gln
 1790 1795 1800 1805
 gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg ggc cgc acc ggg 5881
 Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly
 1810 1815 1820
 gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg cgc tat gag ggc 5929
 Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly
 1825 1830 1835

gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt aca cag cgt cct 5977
 Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg Thr Gln Arg Pro
 1840 1845 1850
 gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc tac cgt gcg gcc 6025
 Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys Tyr Arg Ala Ala
 1855 1860 1865
 ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg taactaccgc 6071
 Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr 1881
 1870 1875 1880
 tccctctcc tccgccacc ccgccgtggg gctccggagg ggaccagct cctctgagcc 6131
 ataccgacca tcgtccagcc ctctacgca gatgctgtca ctggcagagc acagcccacg 6191
 gggatcacag cgtttcagga acgttgccac accaatcaga gaggctagaa catccctggg 6251
 caagtggatg gccagcagg caggcactgt ggcccttctg tccaccagac ccacctggag 6311
 cccgcttcaa gctctctgtt gcgctccgc atttctcatg ctctcttca tgggggtgggg 6371
 ttggggcaaa gcctcctttt taatacatta agtggggtag actgagggat tttagcctct 6431
 tccctctgat ttttctttc ggaatccgt atctgcagaa tgggccactg taggggttgg 6491
 ggtttatattt gttttgtttt ttttttttt ttgtatgact tctgctgaag gacagaacat 6551
 tgccttcttc gtgcagagct ggggctgcc gctgagcgg aggctcggcc gtgggccggg 6611
 aggcagtgt gatccggctg ctctccagc ccttcagacg agatcctgtt tcagctaaat 6671
 gcagggaaac tcaatgtttt ttaagtgtt gttttccctt taaagccttt ttttaggcca 6731
 cattgacagt ggtgggcggg gagaagatag ggaacactca tccctggctg tctatcccag 6791
 tgtgtgttta acattcacag ccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc tggcaaggca 6851
 ttctcatca ccatcgtgtt tgcaaagggtt aaaacaaaaa caaaaaacca caaaaataaa 6911
 aaacaaaaaa aacaaaaaac ccaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct tggcttctgc 6971
 ttcaaaccct caagagggga agcaactccg tgtgcctggg gttcccagg gagctgctgg 7031
 ctgacctggg ccacagagc ctggcttgg tcccagcat tgcagtatgg tgtggtgttt 7091

gtaggctgtg gggctctggct gtgtggccaa ggtgaatagc acaggtagg gtgtgtgcca 7151
caccccatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc ctttcaggtc caggccagt 7211
ggcctggtag cacatgtctg tccctcagagc agggggccaga tgattttcct ccctggtttg 7271
cagctgtttt caaagccccc gataatcgt cttttccact ccaagatgcc ctcataaacc 7331
aatgtggcaa gactactigga cttctatcaa tggctactcta atcagtcctt attatcccag 7391
cttgcctgagg ggcagggaga gcgcctcttc ctctgggcag cgctatctag ataggtaagt 7451
gggggcgggg aagggtgcat agctgtttta gctgagggac gtggtgccga cgtcccaaaa 7511
cctagctagg ctaagtcaag atcaacattc cagggttggg aatgttggat gatgaaacat 7571
tcatttttac cttgtggatg ctagtgtgt agagttcact gttgtacaca gtctgttttc 7631
tatttgtaa gaaaaactac agcatcattg cataattctt gatgtaata aatttgaata 7691
atcagatttc t 7702

請求の範囲

1. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体。
2. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体。
3. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有し、且つCD45に対する特異性を有しない抗体。
4. 配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片を抗原として調製される請求の範囲第1乃至3項のいずれかに記載の抗体。
5. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載の抗体。
6. 免疫原としてLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の抗体。
7. 免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の抗体。
8. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および／または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求の範囲第7項記載の抗体。
9. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティーによって精製されるもの

であって、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第8項記載の抗体。

10. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第6乃至9項のいずれかに記載の抗体。

11. 受託番号がFERM BP-6343であるハイブリドーマにより産生される、LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有するモノクローナル抗体。

10. 12. 約150 kDaの分子量を有する請求の範囲第5乃至11項のいずれかに記載の抗体。

13. 請求の範囲第5乃至10項または第12項記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。

14. 受託番号がFERM BP-6343であるハイブリドーマ細胞系。

15. 15. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原としてLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を用いることを特徴とする方法。

20. 16. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることを特徴とする方法。

25. 17. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および／または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求

の範囲第 1 6 項記載の方法。

- 1 8. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティーによって精製されるものであつて、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第 1 7 項記載の方法。

1 9. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第 1 5 乃至 1 8 項のいずれかに記載の方法。

- 1 0. 2 0. LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法であつて、請求の範囲第 1 乃至 1 2 項のいずれかに記載の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドの量を測定することを特徴とする定量方法。

- 1 5. 2 1. 前記抗体が、イムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される請求の範囲第 2 0 項記載の定量方法。

- 2 2. LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法であつて、請求の範囲第 1 乃至 1 2 項のいずれかに記載の抗体を用いて被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを単離し、単離されたLARの活性を測定する工程を含む方法。

2 3. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求の範囲第 2 2 項記載の方法。

- 2 5. 2 4. LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法であつて、請求の範囲第 1 乃至 1 2 項のいずれかに記載の抗体を用いてLARのタンバ

ク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを単離する工程を含む方法。

25. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求の範囲第24項記載の方法。

26. LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であって、請求の範囲第1乃至12項のいずれかに記載の抗体を用いて免疫組織学的検査を行い、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出する工程を含む方法。

27. 甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体。
28. 甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する請求の範囲第1乃至12項のいずれかに記載の抗体。
29. 甲状腺癌の診断方法であって、
- 15 甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料を採取し、請求の範囲第27または28項に記載の抗体と該組織試料との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする方法。

30. 前記甲状腺組織試料が穿刺吸引細胞診により採取される試料であり、イムノアッセイによって免疫反応性が評価される請求の範囲第29項記載の方法。

31. 前記甲状腺組織試料が甲状腺組織切片であり、組織染色によって免疫反応性が評価される請求の範囲第29項記載の方法。

32. 甲状腺癌の組織診断用組成物であって、請求の範囲第27または28項記載の抗体を含むことを特徴とする組成物。

33. 請求の範囲第27または28項記載の抗体を用いて甲状腺癌細胞

に対して標的化されたことを特徴とするDDS製剤。

3 4. 前記DDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される1以上の物質を含む請求の範囲第3 3記載のDDS製剤。

5 3 5. 前記DDS製剤が、甲状腺癌の診断用医薬組成物である請求の範囲第3 3または3 4記載のDDS製剤。

3 6. 前記DDS製剤が、甲状腺癌の治療用医薬組成物である請求の範囲第3 3または3 4記載のDDS製剤。

3 7. さらに抗癌剤を含む請求の範囲第3 6項記載のDDS製剤。

1 0 3 8. 前記核酸がアンチセンス核酸またはリボザイムである請求の範囲第3 6または3 7項記載のDDS製剤。

3 9. LARのmRNAに対するプローブを用いることによる甲状腺癌の診断方法。

要 約 書

- LARのホスファターゼサブユニット、特にホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに特異性を有する抗体、その製造方法およびかかる抗体を生産する細胞ならびに、この抗体を使用したLAR/LAR由来分子の定量、検査方法、さらに甲状腺癌の診断および治療におけるこの抗体の用途を開示する。
- 5

特許協力条約

Request

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

角田 嘉宏

殿

あて名

〒650-0031

兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/03054

RO105

発送日（日、月、年）

15.06.99

出願人又は代理人
の書類記号

99P133WO

国際出願番号

PCT/JP99/03054

国際出願日（日、月、年）

07.06.99

重 要 な 通 知

優先日（日、月、年）

08.06.98

出願人（氏名又は名称）

扶桑薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、15日06月99年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年06月08日 (08. 06. 1999) 火曜日 12時06分25秒

99P133W0

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	99P133W0
I	発明の名称	L A R のホスファターゼサブユニットに対する抗体
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	扶桑薬品工業株式会社
II-4ja	名称	FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
II-4en	Name	541-0045 日本国
II-5ja	あて名:	大阪府 大阪市
II-5en	Address:	中央区道修町1丁目7番10号 7-10, Dosho-machi, 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	066-969-3131
II-9	ファクシミリ番号	066-969-0918

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年06月08日 (08. 06. 1999) 火曜日 12時06分25秒

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja III-1-4en III-1-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	山元 弘 YAMAMOTO, Hiroshi 560-0054 日本国 大阪府 豊中市 桜の町7丁目11-103 11-1-103, Sakurancho 7-chome, Toyonaka-shi, Osaka 560-0054 Japan
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	辻川 和文 TSUJIKAWA, Kazutake 666-0145 日本国 兵庫県 川西市 けやき坂3丁目11-7 11-7, Keyakizaka 3-chome, Kawanishi-shi, Hyogo 666-0145 Japan
III-2-5en	Address:	
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	内野 由紀子 UCHINO, Yukiko 562-0031 日本国 大阪府 箕面市 小野原東1丁目1-60-307 1-60-307, Onoharahigashi 1-chome, Minoh-shi, Osaka 562-0031 Japan
III-3-5en	Address:	
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年06月08日 (08.06.1999) 火曜日 12時06分25秒

99P133W0

III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-4-2 III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	小西 登 KONISHI, Noboru 634-0051 日本国 奈良県 橿原市 白橿町7丁目8番17号 7-8-17, Shirakashi-cho, Kashihara-shi, Nara 634-0051 Japan
III-4-5en	Address:	日本国 JP 日本国 JP
III-4-6 III-4-7	国籍(国名) 住所(国名)	
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja IV-1-2en IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 電話番号 ファクシミリ番号 電子メール	代理人 (agent) 角田 嘉宏 SUMIDA, Yoshihiro 650-0031 日本国 兵庫県 神戸市中央区 東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Arco Patent Office 3rd. Fl., Bo-eki Bldg., 123-1, Higashimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0031 Japan 078-321-8822 078-391-5791 office@arco.chuo.kobe.jp
IV-2 IV-2-1ja IV-2-1en	その他の代理人 氏名 Name(s)	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 高石 郷; 古川 安航; 阪本 英男; 西谷 俊男 TAKAISHI, Satoru; FURUKAWA, Yasuyuki; SAKAMOTO, Hideo; NISHITANI, Toshio
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA JP KR US

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年06月08日 (08.06.1999) 火曜日 12時06分25秒

V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国際出願に基づく優先権主張	1998年06月08日 (08.06.1998) PCT/JP98/02542 日本国 JP
VI-1-1	先の出願日	
VI-1-2	先の出願番号	
VI-1-3	受理官庁名	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	照合欄	用紙の枚数
VIII-1	願書	5
VIII-2	明細書 (配列表を除く)	50
VIII-3	請求の範囲	5
VIII-4	要約	1
VIII-5	図面	14
VIII-6	明細書の配列表	26
VIII-7	合計	101
VIII-8	添付書類	添付
VIII-15	手数料計算用紙	✓
VIII-16	計算機読取可能な媒体によるマルチ及び/又はアミノ酸配列リスト	別個のフレキシブルディスク
VIII-17	PCT-EASYディスク	フレキシブルディスク
VIII-18	その他	優先権書類送付請求書
VIII-19	要約書とともに提示する図の番号	6
IX-1	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1-1	提出者の記名押印	角田 嘉宏
IX-1-1	氏名(姓名)	
10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	

受理官庁記入欄

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年06月08日（08.06.1999）火曜日 12時06分25秒

99P133W0

10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約に基づく国際出願願書(願書付属書
—手数料計算用紙)

原本(出願用) - 印刷日時 1999年06月08日 (08.06.1999) 火曜日 12時06分25秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	(付属書) この特許協力条約に基づく国際出願願書付属書(様式 - PCT/R0/101(Annex))は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	99P133W0		
2	出願人	扶桑薬品工業株式会社		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000	
12-3	国際手数料			
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,800		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	71		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,300		
12-6	合計の手数料 b2	92,300		
12-7	b1 + b2 = B	147,100		
12-8	指定手数料			
	国際出願に含まれる指定国数	6		
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	6		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	12,600		
12-11	合計の指定手数料 D	75,600		
12-12	PCT-EASYによる料金の減額 R	-16,900		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	205,800	
12-14	優先権証明書請求手数料			
	優先権証明書を請求した数	1		
12-15	1優先権証明書当たり の手数料 (X)	1,500		
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,500	
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	302,300	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙		

原本(出願用) - 印刷日時 1999年06月08日 (08.06.1999) 火曜日 12時06分25秒

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 注釈	6586 弁理士 角田嘉宏 SUMIDA, Yoshihiro 8896 弁理士 高石 郷 TAKAISHI, Satoru 10624 弁理士 古川安航 FURUKAWA, Yasuyuki 10816 弁理士 阪本英男 SAKAMOTO, Hideo 11095 弁理士 西谷俊男 NISHITANI, Toshio
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
13-2-5	EASYによるチェック結果 生物	Green? 寄託された生物材料: PCT締約国によっては、寄託された生物材料の特徴 に関する情報を出願時に明細書に記載することを義 務づけている国がありますので、確認してください 。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限 り、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要性 があります。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて 他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言 及を用いた表示の有効性について確認してください 。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言 語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字 以外の文字について、願書と電子データを注意して 比較してください。

0-1	寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)(様式 - PCT/RO/134(EASY))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	99P133W0
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	11
1-2	行	21
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学技術研究所(NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1998年05月07日 (07.05.1998)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-6343
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

77

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D -5 JUN 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 99P133WO	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03054	国際出願日 (日.月.年) 07.06.99	優先日 (日.月.年) 08.06.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20, C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395		
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
この附属書類は、全部で 19 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.08.99	国際予備審査報告を作成した日 22.05.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 引地 進	4 N 9 5 4 9
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-3, 5-6, 9-13, 16-18, 21-24, 27-31, 33-46 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 21-24, 27-31, 33-46 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 4, 7-8, 14-15, 19-20, 25, 25/1, 26, 32, 47-50 ページ、 21, 01, 00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 1-39 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-9, 14 ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 10-13 ページ/図、 21, 01, 00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-26 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

☐ 國際出願全体

☒ 請求の範囲 29-31, 39

X この国際出願又は請求の範囲 29-31, 39 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲29-31, 39は、ヒトを診断する方法を実質含んでいるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲
裏付けを欠くため、見解を示すことができない。 _____ が、明細書による十分な

☒ 請求の範囲 29-31, 39 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-28, 32-38 有
 請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 7-10, 16-19, 27-28, 32-38 有
 請求の範囲 1-6, 11-15, 20-26 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-28, 32-38 有
 請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲 1-6, 11-15, 20-26

文献1: J. Exp. Med. 168 [5] (1988) p. 1523-1530

には、ヒトLAR(白血球共通抗原類似分子)をコードするcDNAの塩基配列及びその推定アミノ酸配列が記載されており、このうちアミノ酸配列については、膜貫通領域が図示され、細胞内ドメイン(ホスファターゼドメイン)及び細胞外ドメインがどこであるかも明確に記載されている。

文献2: EMBO J. 11 [3] (1992) p. 897-907

には、LAR-LCA(白血球共通抗原)の融合蛋白質を発現させて、LARに反応性を有するモノクローナル抗体の特徴付けを行うこと、LARをコードするcDNA配列の一部を欠失させて、細胞外ドメイン(E-サブユニット)と細胞内ドメイン(P-サブユニット)に分割するのに必要な部位を見つけたことが記載されている。

文献3: Tissue Antigens 42 [4] (1993) p. 441

には、CD45(LCA)のホスファターゼドメイン(細胞内ドメイン)のVHCS AGVを免疫原としてモノクローナル抗体AE-6を作成し、この抗体がCD45のアイソフォームp180と反応したことが記載されている。

してみると、文献3により、LCAのホスファターゼドメインの免疫原性が明らかであり、LCAの類似分子であるLARのホスファターゼドメインも同様に免疫原性を有していることが予想されるから、文献1記載のLARホスファターゼドメインの全体またはその一部を文献2記載の方法に基づいて発現させ、得られたポリペプチドを主な免疫原として、文献3記載の抗体の製造方法に基づいて、LARのホスファターゼドメインに対して特異性を有するモノクローナル抗体を作製することは、当業者が容易になし得ることである。このようにして得られたモノクローナル抗体をLAR分子の定量及び単離に使用しようとすることは、当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

あった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた

(Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988,
Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-
7186, 1988)。

5 現在までに多くのPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ
今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J.*

Exp. Med., 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*
, 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Bioph*
ys. Acta, 1095, 46-56, 1991)。PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ膜型

1 0 PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD
45のほか、PTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ および、ならびにLAR)と、(2)細胞
膜貫通部分を持たない細胞質型PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、
STEPおよびPTP1C)とに大別される。

膜型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分 (ドメイン 1およびドメ
1 5 イン 2、第1図(a)および(b)参照) を持っている。現在までに報告され
ているPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-
Gly (配列番号: 2) というシステインを含む配列 (signature motif) が
ホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフ
ィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成してお
2 0 り、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接関与している
ことが明らかにされた (Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-
1404, 1994)。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオ
ニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPと
セリン/スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示さ
2 5 れた。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における重要性は、
変異実験から明らかにされている (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.*; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。本発明者らは、これらの状況に鑑み、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに特異性を有し、且つCD45に対して特異性を有しない抗体の作製に着手した。

なお、既知のプロテインチロシンホスファターゼに対する抗体としては、CD45の膜貫通領域からホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体 (Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、これらの抗体がLARや、その他プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して如何なる免疫特異性を有するか否かは不明である。ゆえに、CD45に特異性を有さず、LARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を作製する必要もあった。

甲状腺腫瘍には、良性である甲状腺腫と悪性である甲状腺癌がある。現在、臨床においての甲状腺腫瘍の診断は主に、触診、超音波診断、穿刺吸引細胞診および組織切片による診断が行われている。甲状腺腫瘍は腺腫と乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、髄様癌および悪性リンパ腫等に分類され、また甲状腺癌を大きく分類すると分化型甲状腺癌 (乳頭癌および

THIS PAGE BLANK (USPTO)

濾胞癌)と未分化型甲状腺癌に分類することができる。

甲状腺癌の診断には、触診および超音波診断にて異常があった場合、主として患者への負担が少ない穿刺吸引細胞診が行われており、確定診断ができない場合には、甲状腺組織を切除する組織診断が行われている。

- 5 。しかし、組織診断の場合には患者への負担が大きく、また正常である組織も切除する可能性がある。実際のところ、細胞診による良性／悪性の鑑別は時に難しく、組織診断に委ねられる場合が多々存在する。また、穿刺吸引細胞診は、組織切片による形態学的観察に比較して細胞と細胞との結合を破壊するため、確定的な診断が下せない。さらに、大部分
- 1 0 の濾胞癌においては、細胞診のみならず組織診断を行っても良性と悪性の鑑別が難しいことがある。ゆえに、臨床医あるいは病理医からは穿刺吸引細胞診にて良性／悪性の鑑別を的確に行うことができる方法が望まれており、また、濾胞癌においてもこのような診断困難症例によりの確に判定できる方法が切に望まれていた。

1 5

[発明の開示]

本発明は、LARのホスファターゼサブユニット、特に細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明によって、LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有、且つ他のプロテインホスファターゼには特異性を有しな

THIS PAGE BLANK (USPTO)

また、本発明でさらに企図されるのは、LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた*in situ*免疫組織染色などの技術が採用され、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出するものである。

本発明はさらに、甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体を企図する。この抗体は、LAR分子のみならず、その断片例えば、ホスファターゼドメイン、細胞外ドメイン等を抗原とした抗体であってよく、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、ペプチド抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR-移植抗体などが含まれる。特に、如上のLARのホスファターゼサブユニットに対する抗体で、甲状腺癌細胞との免疫反応性を有するものが本発明によって提供される。甲状腺癌細胞に対して特異的免疫反応を有するとは、正常の甲状腺細胞や良性腫瘍の甲状腺細胞には殆ど反応せず（正常細胞の約10%以下）、甲状腺癌細胞によく反応する（癌細胞の約20%以上）ことを意味する。

従って、この抗体を利用して、甲状腺癌を診断することが可能になり、本発明において甲状腺癌の組織診断方法を企図するものである。この診断方法は、甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料（検体）を採取し、前記抗体と検体との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする。この場合、甲状腺組織検体は、被験者より注射針等を用いた穿刺吸引細胞診により採取した検体でも、また甲状腺の一部を切除、摘出して調製した甲状腺組織切片等のいかなる検体でもよい。穿刺吸引細胞診により採取した検体を用いる診断方法は、被験者に対する侵襲性が低いという点でより好ましい。これ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

は、組織形態学的検査に基づく甲状腺癌診断法では、侵襲性の高い切開法を余儀なくされていたことに鑑みて本発明により提供される重要な利点である。なお、組織切片を用いた診断においても、従来の方法よりも格段に診断の信頼性が高いので有用である。

- 5 前記診断方法において、穿刺吸引細胞診により得られた検体は、本発明の抗体を用いて例えばイムノブロッティング、免疫沈降またはELISA等の、汎用されているin vitroのイムノアッセイによって免疫反応性が評価される。そして、組織切片を検体とした場合、従来の免疫反応を利用した組織染色によって免疫反応性が判定される。
- 10 さらに本発明は、甲状腺癌の組織診断用組成物であって、上記抗体を含むことを特徴とする組成物を提供する。この組成物を用いて、前記したとおり信頼性の高い甲状腺癌の診断方法を実施することができる。組成物には、本発明の抗体の他に、適宜の賦形剤、担体、緩衝液、抗体を安定化するための薬剤等を配合するとよい。
- 15 このように、本発明によって、LARが甲状腺癌細胞に特異的に高発現することが判明した。また、実施例に示すように本発明のモノクローナル抗体が甲状腺癌の診断に有用であることも証明された。さらに、本発明のモノクローナル抗体が組織切片を用いた甲状腺癌の診断に有用であり（実施例5、6参照）、また組織をホモジナイズした方法による診断にも有用である（実施例7参照）ことが判明した。以上の結果より、当業者であれば本発明のモノクローナル抗体は種々の細胞診あるいはバイオプシーに有用であることが理解できる。さらに、本発明のモノクローナル抗体のみならず、LAR細胞外ドメインを認識することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および／またはペプチド抗体をも利用
- 20
- 25 することができる。この場合であっても本発明のモノクローナル抗体と

THIS PAGE BLANK (11SP70)

既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

本発明はまた、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化（ターゲッティング）されたことを特徴とするDDS製剤を提供する。

甲状腺癌に関与する遺伝子はこれまでに種々明らかにされてきている。乳頭癌患者の一部でRetやTRK遺伝子のチロシンキナーゼドメインの変異が認められた (Fusco, A. et al. ; Nature, 328, 170-2, 1987) 。またRetの変異は過去に放射線被曝の既往のない乳頭癌患者の3-30%に見られ (Santoro, M. et al. ; J. Clin. Invest., 89, 1517-22, 1992、Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996、Zou, M. et al. ; Cancer, 73, 176-80, 1994) 、チェルノブイリ原発事故の際、被曝した子どもおよび小児時代に放射線の外照射を受けた既往のある患者から診断される乳頭癌では、Retの変異は60-80%と高率に見出され (Fugazzola, L. et al. ; Cancer Res., 55, 5617-20, 1995、Klugbauer, S. et al. ; Oncogene, 11, 2459-67, 1995、Nikiforov, Y. E. et al. ; Cancer Res., et al. ; 57, 1690-4, 1997、Bounacer, A. et al. ; Oncogene, 15, 1263-73, 1997) 、TRK遺伝子変異の頻度は極めて低い (Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996) 。Ras遺伝子の点変異は

THIS PAGE BLANK (USPTO)

甲状腺濾胞癌において高頻度に見られる。これはras遺伝子の点変異は腫瘍発生初期の段階であると考えられている (Fagin, J. A. ; Molecular pathogenesis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 7th ed.

- 5 Philadelphia: Lippincott-Raven, 909-16, 1996, Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995) 。 TSHや刺激性G蛋白をコードしている遺伝子の活動性変異が一部の甲状腺濾胞癌において報告されている (Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995、Russo, D. et al. ; Oncogene, 11, 1907- 11, 1995) 。 さらに癌抑制遺伝子であるp53の
- 1 0 変異は分化型甲状腺癌では希であるが、未分化癌では高頻度に認められることも報告されている (Fagin, J. A. et al. ; J. Clin. Invest., 91, 179-84, 1993、Ito, T. et al. ; Cancer Res., 52, 1369-71, 1992) 。

- これら公知の情報から、甲状腺癌の治療または診断を目的とした核酸
- 1 5 を、LARに対する抗体によりターゲッティングされたDDS製剤中に含有させることができる。

- また、甲状腺癌細胞の増殖は甲状腺刺激ホルモン (TSH) によって調節されており、甲状腺ホルモン剤投与による甲状腺刺激ホルモン (TSH) 分泌の抑制は、再発や生存率を改善することも知られている。ゆえに、TSHの作用を阻害するようなタンパク質、核酸あるいは化合物もDDS製剤中に含有
- 2 0 させることができる。

- 一方、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化されたことを特徴とする本発明のDDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される 1 以上の物質を含んでいてもよく、かような物質を製剤中に配合することによって、甲状腺癌細胞への標
- 2 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。
十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合にはin vitroで抗原感作を行うこともできる。

上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

また、そのような抗体をヨードで放射標識するあるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、診断・治療薬として有用性が増す場合がある。

乳頭癌や濾胞癌が一度血行性またはリンパ行性に周囲の組織、または離れた部位(特に肺と骨)やリンパ節に転移した場合、癌細胞を破壊するために放射性ヨード(^{131}I)を投与するのが一般的な治療となっている。正常甲状腺細胞は血液からヨードを取り込み濃縮する。そしてこの過程は下垂体からのTSH(甲状腺刺激ホルモン)により刺激される。その後ヨードは甲状腺ホルモン(サイロキシシンT₄)を作るのに使われる。上記述べたように、甲状腺癌または甲状腺癌が転移した部位は、正常な場合はごくわずかの量のヨード(または放射性ヨード)しか取り込まない。しかし、大量のTSHの影響下にある時は、甲状腺癌、またはその転移した部位の一部は刺激を受けて、相当量のヨードを取り込むようになる。これにより、周囲の組織を損なうことなく、癌に直接大量の放射線が照射されることになる。甲状腺が存在しており、正常な量の甲状腺ホルモンを産生している場合は、下垂体のTSHの産生量は比較的低いままに留まっているが、甲状腺全体が取り除かれたり、破壊されたりして甲状腺ホルモンのレベルが下がると下垂体はTSHの分泌を急激に増加する。このTSHが甲状腺癌を刺激し、放射性ヨードを取り込むようにする。進行した甲状腺癌に対し、放射性ヨード療法を行なう場合は、甲状腺全体を手術でほぼ完全に取り除き、残留した組織を放射性ヨードを使って破壊する必要がある

THIS PAGE BLANK (USPTO)

。一度これを行なったら

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 、頸部に癌細胞が残っているか、離れた場所に転移があることがわかって
いる患者には、TSHのレベルが十分に高ければ、試験量の放射性ヨード
(通常は約2から10ミリキュリー)を使ってスキャンを行う。もし、相当
量のヨードが甲状腺癌の領域に集まっていれば、さらに大量の治療量の
- 5 放射性ヨード(通常100-200ミリキュリー：3700から7400MBq)を与え、癌
細胞の破壊を試みる。より浸潤性の強い甲状腺癌のある患者に対しても
、放射性ヨードが安全で有効であるため、多くの医師がそれ程浸潤性の
強くない乳頭癌や濾胞癌にも、放射性ヨードを日常的に使うようになって
いる。
- 1 0 ゆえに、LARに結合する抗体をヨード標識する、あるいは抗体でターゲ
ティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、
さらに甲状腺癌細胞への特異性を増強し、治療または診断に用いること
ができる。
- この様に甲状腺癌細胞を特異的に認識する抗LAR抗体はドラッグデリバ
リーシステム(Drug Delivery System: DDS)においても有用である。ドラ
ッグデリバリーシステム(橋田充；ドラッグデリバリーシステム 創薬と
治療への新たな挑戦，化学同人(1995))は、薬物の投与方法や形態を
工夫し、体内での薬物動態を制御することにより薬物を標的部位に選択
的に送り込み、結果として最適の治療効果を得、さらに薬物による副作
用を最小限にとどめることを目的とした薬物投与に関する新しい技術で
ある。現在までに様々な DDS製剤が開発されているが、なかでもリポソ
ーム製剤(寺田弘，吉村哲朗編；ライフサイエンスにおけるリポソーム
実験マニュアルシュプリンガー・フェアラーク東京(1992))は欠損酵素の
補充、制癌剤および抗生物質の投与、さらには遺伝子治療の分野におい
ても脚光を浴びている。
- 2 5 リポソームは生体膜を構成しているリン脂質を基本とする脂質二重層

THIS PAGE BLANK (11SP70)

第8図は、インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化を示すイムノブロットを表す図である。

第9図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

第10図は、本発明の抗体YU1のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常甲状腺および癌組織のイムノブロッティングの結果を示す図である。

第11～13図は、本発明の抗体YU1を用いたヒト甲状腺癌組織切片の免疫染色における、癌細胞の陽性染色結果を示す図である。

第14図は、本発明の抗体YU1を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べたイムノブロッティングの結果を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

[実験例1] LAR変異体によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化ならびにLARとインスリンレセプターとの会合に関する検討

先ず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするために、LARのPTPドメインの触媒活性中心に存在するシステインをセリンに変換することにより作製した、変異型LARを用いるというストラテジーにより解析を進めた。

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

LAR発現ベクターとして、(a) LAR WT：ヒト野生型LAR（配列番号：3）、(b) LAR C/S：LAR-PTPドメイン1の活性中心にあるシステイン（配列番号：3のアミノ酸第1522位）を、配列番号：3のヌクレオチド第4983位のGをCに置換することによりセリンへと変換したもの、ならびに(c) LAR DC/S：LAR C/Sにおける変異に加えて、さらにLAR-PTPドメイン2の

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(原液を1000倍希釈)を滴下後、そのまま湿潤箱の中で90分間放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄した後、二次抗体 (ビオチン化抗マウスイムノグロブリン) を滴下し
5 45分放置した。

その後、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄し、ストレプトアビジン接合セイヨウワサビペルオキシダーゼを滴下後、25分放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄後、0.02% 過酸化水素および0.15M NaCl を含む0.05%DAB (3,3'-ジ
10 ミノベンチジン四塩酸)の50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) を滴下し、顕微鏡下で発色を確認し、水の中にスライドガラスを浸すことによって反応を停止させた。

反応停止後、マイヤーのヘマトキシリンに5-10秒間浸し、後染色を行った。その後、水洗し、100%エタノールに1分間×2回、100%キシレンに1分間×2回浸した後、マリノールで封入し、観察した。
15

尚、ブロッキング、二次抗体、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ溶液はDAKO Japan Co. Ltd., (Kyoto)のLSAB キットを用い、DABはDojindo (Kumamoto)の試薬を、MalinolはMuto Pure Chemicals Ltd., (Tokyo)を、マイヤーのヘマトキシリンは自作のものを使用した。
20

こうして得られた甲状腺乳頭癌細胞の免疫染色の結果を図11～13に示す。これらの図から、甲状腺癌細胞にYU1抗体が選択的に結合し (褐色染色部)、正常の濾胞細胞および腫瘍組織の間質には結合しない (青色染色部) ことが判る。

25 従って、この抗体を用いて甲状腺癌の組織切片染色による診断が可能であること、さらにはこの抗体が抗癌剤 (化学療法剤) を含むDDSシステ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ムにおいて有用であることも明らかになった。

〔実施例 6〕 他の良性腫瘍細胞および癌細胞組織の免疫染色

実施例 5 に記載したと同様の手順により、以下の表 1 に示す種々の良
5 性腫瘍細胞および癌細胞（ヒト由来）の免疫染色を実施した。

YU1抗体との結合性に基づく染色が認められたものを陽性として、その
割合を以下の表 1 に示す。

表 1

1 0

1 5

2 0

2 5

腫 瘍		症例	陽性例数	陽性率
良 性	髄膜腫	10	0	0
	甲状腺腺腫	10	0	0
悪 性	甲状腺癌	21	21	100
	グリオーマ	13	1	7.7
	胃癌	16	1	6.3
	大腸癌	26	13	50
	肺癌	20	2	10
	乳癌	20	3	15
	肝癌	8	0	0
	腎癌	21	0	0
	前立腺癌	32	2	6.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

この結果、甲状腺癌での陽性率は100%であり、良性腫瘍やその他の臓器の癌では陽性率が低いか、または完全に陰性であることが明らかになった。大腸癌で比較的高い陽性率が示されているが正常の腺細胞にも陽性を示すことから、甲状腺癌におけるものと異なっており、顕著な染色が認められた甲状腺癌細胞に対するYU1の特異的免疫反応性が示唆された。

[実施例7] YU1による甲状腺癌の特異的免疫反応：イムノアッセイ利用可能性の検討

10 実施例5で使用したヒト甲状腺癌組織および正常組織各1gに対し、冷細胞溶解用バッファー（同上）3mlを加え、氷上でポリトロンを用いてホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4℃、15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上清を用いた。タンパク定量はDC Protein Assay（バイオラッド）のマニュアルに従って行った。

15 得られた上清（タンパク質1mgに相当）、あるいは陽性対照として、COS-7細胞にヒトLARをトランスフェクトし、抗LAR抗体を用いて免疫沈降したもの（実験例1a～cに記載の手順に従って、調製）を電気泳動後、実験例1、e欄に記載した方法に従ってYU1を用いてイムノブロットを行った。検出にはImmunoStar Reagents（和光純薬工業）を用いた。

20 こうして得られた結果を図10に示す。図10に示されるとおり、YU1は正常の甲状腺細胞と異なり、甲状腺癌細胞を特異的に認識することが明らかになった。従って、甲状腺の穿刺吸引細胞診によって得られる組織試料を甲状腺癌の診断に利用できることが判った。

25

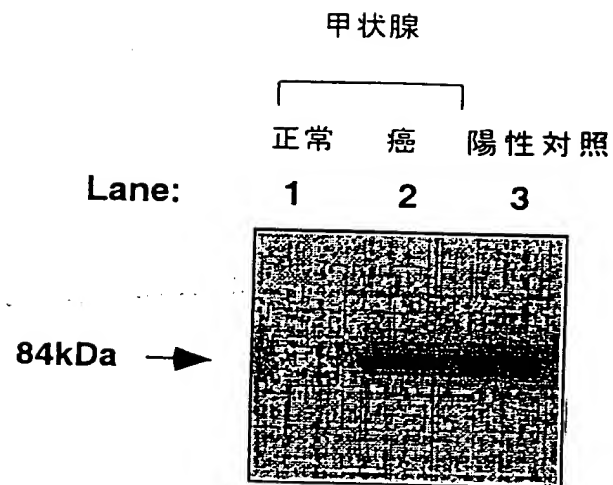
[産業上の利用可能性]

THIS PAGE BLANK (11SP70)

- 本発明によって提供される、LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体は、ホスファターゼ活性を有するLARの細胞内ドメインを特異的に認識することができる。従って、この抗体は、インスリンのシグナル伝達機構を解明したり、LARのモジュレーターや結合タンパク質等を同定、
- 5 取得するために極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

- さらに本発明の抗体は、甲状腺癌に対する特異的免疫反応性を有する
- 10 ので、穿刺吸引細胞診や組織切片を用いた甲状腺癌の診断、甲状腺癌治療のためのDDSを利用した医薬組成物などに有用であり、また、甲状腺癌細胞におけるLAR分子の転写、翻訳レベルでの発現調節因子の分子生物学的研究にも貢献することができる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第11図

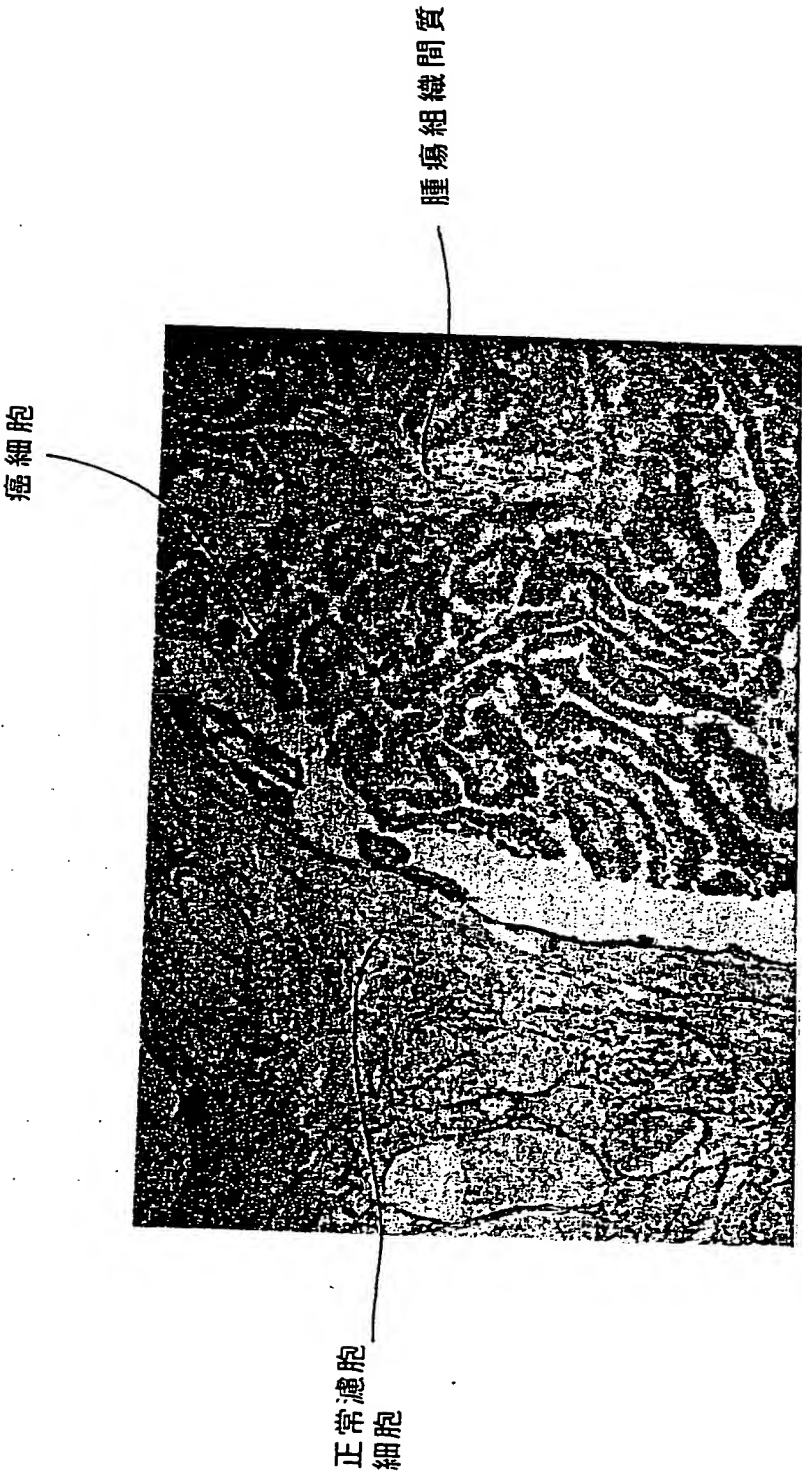
11
14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第12図

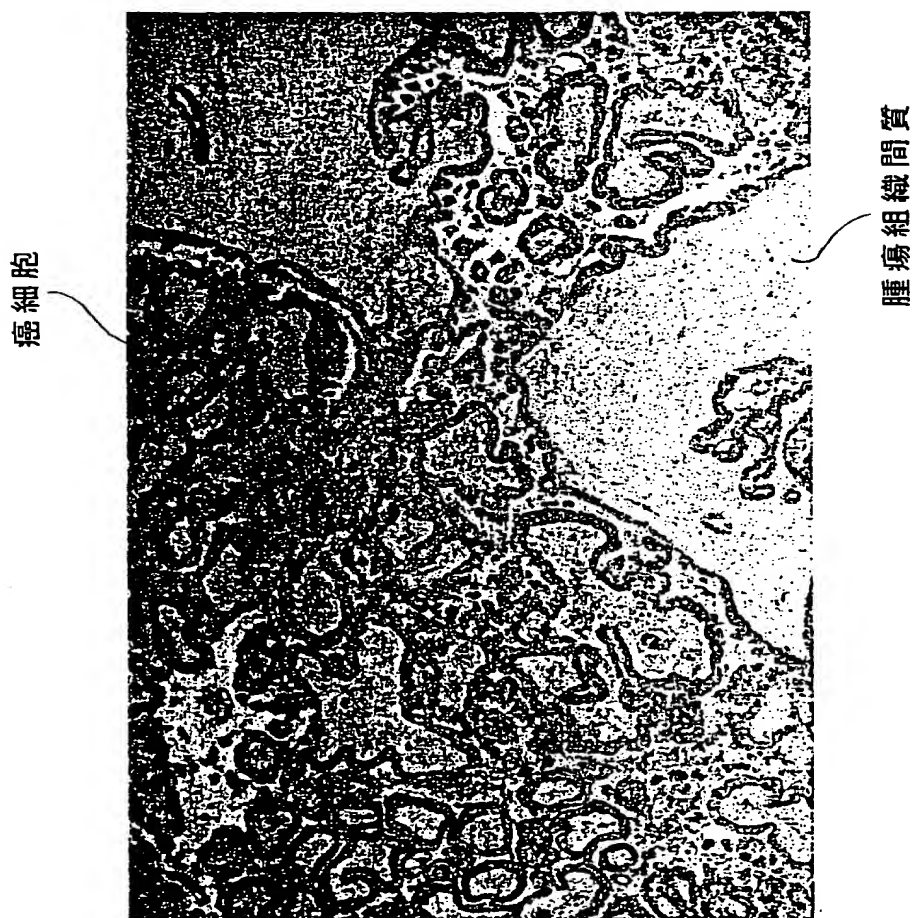
12
/ 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第13図

13
/ 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

#5, #7

Inter. Pub.
with Int'l
Search
Report

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/62, 15/63, 5/20, C07K 16/30, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577, A61K 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/64591</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月16日 (16.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03054</p> <p>(22) 国際出願日 1999年6月7日 (07.06.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平PCT/JP98/02542 1998年6月8日 (08.06.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山元 弘 (YAMAMOTO, Hiroshi) [JP/JP] 〒560-0054 大阪府豊中市桜の町7丁目11-1-103 Osaka, (JP) 辻川和丈 (TSUJIKAWA, Kazutake) [JP/JP] 〒666-0145 兵庫県川西市けやき坂3丁目11-7 Hyogo, (JP) 内野由紀子 (UCHINO, Yukiko) [JP/JP] 〒533-0004 大阪府大阪市東淀川区小松1丁目15-20-213 Osaka, (JP) 小西 登 (KONISHI, Noboru) [JP/JP] 〒634-0051 奈良県橿原市白橿町7丁目8番17号 Nara, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 角田嘉宏, 外 (SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有吉特許事務所 Hyogo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: ANTIBODY AGAINST LAR PHOSPHATASE SUBUNIT</p> <p>(54) 発明の名称 LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体</p> <p>(57) Abstract An antibody specific for LAR phosphatase subunit, in particular, the intracellular domain of LAR phosphatase subunit; a process for producing the same; cells producing the above antibody; a method for quantitating and examining LAR/LAR-derived molecules by using this antibody; and utilization of this antibody in diagnosing and treating thyroid cancer.</p> <div data-bbox="1153 1260 1461 1827"><p>a ... MARKER</p></div>		

(57)要約

LARのホスファターゼサブユニット、特にホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに特異性を有する抗体、その製造方法およびかかる抗体を生産する細胞ならびに、この抗体を使用したLAR/LAR由来分子の定量、検査方法、さらに甲状腺癌の診断および治療におけるこの抗体の用途を開示する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LS	レソト	SK	スロバキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LT	リトアニア	SL	シエラレオネ
BB	バルバドス	GG	グレンダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GM	ガンビア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MA	モロッコ	TD	チャド
BG	ブルガリア	CN	ギニア・ビサウ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TH	タイ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HU	ハンガリー			TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IN	インド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CN	中国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CR	コスタリカ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CY	キプロス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
DK	デンマーク			PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ

明 細 書

LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体

5

〔技術分野〕

本発明は、LAR（白血球共通抗原類似分子）においてホスファターゼ活性を担うP-サブユニット（ホスファターゼサブユニット）に対して特異性を有する抗体、特にLARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体およびその調製方法に関し、さらに詳細には、プロテインチロシンホスファターゼの解析および定量、LAR関連分子の同定および取得、ならびにインスリン抵抗性に関わる症状の治療、予防、緩和等のための処置や診断に適用可能な医薬の開発などに有用な抗体に関する。また本発明は、甲状腺癌の診断、治療等に有用な抗体に関する。

10

15 〔背景技術〕

近年、動脈硬化発症メカニズムが徐々に明らかにされ、その危険因子が同定されつつある。特に高コレステロール血症、高血圧症、糖尿病および喫煙が動脈硬化の4大危険因子と認定され、その治療が積極的に行われている。これらの病態として臨床的に共通しているのが、インスリン抵抗性である。インスリン抵抗性とは細胞におけるインスリン感受性の低下とほぼ同義語であり、細胞での糖の取り込みにおけるインスリン作用が低下していることを指す。その原因としてはインスリン分泌自体の異常、標的細胞におけるインスリン受容体の異常、細胞内情報伝達系の異常および血行力学的に末梢循環障害に基づく糖の組織への供給減等

20

25

がある。Reavenは1988年、このインスリン抵抗性を基盤として多くの病態が引き起こされることを報告し、また、インスリン抵抗性、耐糖能異

常、高インスリン血症、高トリグリセライド血症、低 HDL コレステロール血症、高血圧をマルチプルに持つ病態をシンドローム X と名付け、動脈硬化発症に深く関わっていることを提唱した (Reaven, G. M. *et al.* ; *Diabetes*, 37, 1595-1607, 1988)。

- 5 また、一般的にインスリン抵抗性により細胞への糖の供給は低下し、
膵臓におけるインスリン分泌を亢進させ、高インスリン血症を引き起こ
すことが知られており、臨床の場合においてもインスリン抵抗性の問題が
種々浮上している。例えば、インスリン抵抗性・高インスリン血症が糖
尿病性腎症を促進し (Niskanen, L. *et al.* ; *Diabetes*, 41, 736-741,
1 0 1993)、糖尿病性網膜症の頻度が高くなる (Yip, J. *et al.* ; *Lancet*,
341, 369-370, 1993) という報告がある。さらに、インスリン抵抗性によ
ってプラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1 (PAI-1) の活性が上昇し、
血液線溶系機能を低下させたり (Potter van Loon BJ *et al.* ; *Metab.*
Clin. Exp., 42, 945-954, 1993)、粥状動脈硬化の引き金になる
1 5 (Sato, Y. *et al.* ; *Diabetes*, 38, 91-96, 1989) という文献等も報告
されている。

- 糖尿病は有病率が全人口の 5% を占め、日本人の約 600 万人が罹患し
ている。糖尿病にはインスリン依存性糖尿病 (IDDM) とインスリン非依
存性糖尿病 (NIDDM) がある。IDDM は糖尿病全体に対して約 7%、NIDDM
2 0 は約 90% といわれ、特に、糖尿病の大多数を占める NIDDM の発症は、イン
スリン抵抗性が重要な成因と考えられている。

- 現在までに、インスリンのシグナル伝達には細胞内蛋白質のチロシン
リン酸化が重要な役割を演じていることが明らかとされている。インス
リンレセプターは分子量約 135 kDa の α サブユニットと 95 kDa の β サブ
2 5 ユニットの 2 つの糖タンパクサブユニットがジスルフィド結合によりヘ
テロテトラマーを形成し、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造をとる。 α サブユニットはインス

- リン結合活性を有し、 β サブユニットは自己リン酸化により活性化する
プロテインチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase : PTK) ドメイ
ンを有する。すなわち、インスリンがインスリンレセプターの α 鎖に結
合すると、インスリンレセプター β 鎖に存在するいくつかの特定のチロ
シン残基がレセプターのチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化され
る。インスリンレセプターチロシンキナーゼは自己チロシンリン酸化に
よってそのチロシンキナーゼ活性がさらに上昇する。このようにして活
性化されたインスリンレセプターチロシンキナーゼは、細胞内に存在す
るその基質である IRS (insulin receptor substrate) をチロシンリン
酸化し、このチロシンリン酸化 IRS-1を Ash/Grb2やPI-3 キナーゼが認
識して結合することによりシグナルが伝達され、最終的にグルコースの
取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリンによる生物活性が発現
することが明らかとされている (第9図参照、Goldstein, B. J. *et al.*
; *Receptor*, 3, 1-15, 1993, Kanai, F. *et al.* ; *Biochemical and*
Biophysical Research Communications, 195(2), 762-768, 1993)。しか
し、このインスリンのシグナル伝達において、活性化されたインスリン
レセプターを不活化する酵素、すなわちチロシン脱リン酸化酵素である
プロテインチロシンホスファターゼ (Protein Tyrosine Phosphatase、
以下、PTPと称する)の研究はほとんど進展していない。
- PTPに関する研究が本格的に始まったのは、1988年にFischerのグルー
プによりヒト胎盤由来細胞質型のPTPであるPTP1Bの遺伝子がクローニ
ングされ、そのヌクレオチド配列が解明されてからである (Tonks, N. K.
et al. ; *J. Biol. Chem.*, 263, 6722-6730, 1988, Charbonneau, H.
et al. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。その
結果、PTP1Bと相同性を示したのは既知のセリン/スレオニンホスファ
ターゼではなく、造血系の膜貫通分子であるCD45の細胞質内領域の2カ所で

あった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた

(Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988, Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。

- 5 現在までに多くのPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ
今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J.*
Exp. Med., 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*
, 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Biophys. Acta*, 1095, 46-56, 1991)。PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ膜型
1 0 PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD
45、LARならびにPTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ および ζ)と、(2)細胞膜貫通部
分を持たない細胞質型PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、STEPおよ
びPTP1C)とに大別される。

- 膜型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分 (ドメイン 1およびドメ
1 5 イン 2、第1図(a)および(b)参照) を持っている。現在までに報告され
ているPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-
Gly (配列番号: 2) というシステインを含む配列 (signature motif) が
ホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフ
ィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成してお

- 2 0 り、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接関与している
ことが明らかにされた (Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-
1404, 1994)。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオ
ニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPと
セリン/スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示さ
2 5 れた。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における重要性は、
変異実験から明らかにされている (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9,

2399-2407, 1990)。これらのことから、ドメイン 1の保存されたCysが酵素活性発現に重要であり、またドメイン2は酵素の基質特異性を決めていると考えられている。

PTP酵素群のうち、ヒト由来の LARは、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) であるCD45のホスファターゼドメインをプローブとしてヒト胎盤ゲノムライブラリーによりクローニングされた、受容体型プロテインチロシンホスファターゼである (Streuli M. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 168, 1553-1562, 1988)。CD45が血球系の細胞に特異的に発現しているのに対して、LARは血球系以外の細胞、特に肝臓や骨格筋などのインスリン感受性組織に発現している (Goldstein B. J.; *Receptor*, 3, 1-15, 1993)。多くの受容体型PTPの中でLARはその細胞外ドメインが細胞接着分子と類似しているため、特に興味深い。その全構造は、Ig様ドメインとフィブロネクチンIII型ドメインよりなる 150 kDaの細胞外E-サブユニットと、膜貫通領域および、2つのホスファターゼドメインを持つ細胞内ドメインを含む 85 kDaの P-サブユニット (配列番号: 1 に示される) とが細胞膜のすぐ外側で非共有結合していることが明らかとなっている (第1図参照) (Streuli M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992)。

現在までにLARの機能的な役割が数多く報告されている。例えば、LARが欠損した神経細胞ではニューロトロフィンへの反応性が減少し (Yang, T. *et al.* ; 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana, USA, October 25-30, 1997, *Society for Neuroscience Abstracts*, 23, 1-2, 1997)、LAR活性の抑制によりアポリポ蛋白 Bの分泌が減少すること (Phung, T. L. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(2), 367-371, 1997)、また、LARの発現が欠損することにより前脳基底部のコリ

ン作動性神経細胞のサイズが小さくなり、海馬歯状回でのコリン作動性神経支配が減少する (Yeo, T. T. *et al.*; *J. Neurosci. Res.*, 47(3), 348-360, 1997) ことが報告されている。このように、LARは生体内で様々な役割を担っていることが徐々に明らかになってきているが、現在最も
5 注目が集められている研究として、LARとインスリン受容体との関係がある (Hashimoto, N. *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 267(20), 13811-13814, 1992)。

1995年、肥満者の脂肪組織において LARのチロシンホスファターゼ活性が異常に上昇しており、これがインスリン抵抗性の発症原因として、
1 0 また、心臓血管疾患の危険因子として考えられ、注目されるべきであるとの発表が行われた (Ahmad, F. *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 95(6), 2806-2812, 1995)。以後、LARがインスリン受容体と密接に関与しているという報告が次々になされている (Mooney, R. A. *et al.*; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 709
1 5 -712, 1997, Orr, S. R. *et al.*; *Biochemical Society Transaction*, 25(3), 452S, 1997, Ahmad, F. *et al.*; *J. Clin. Investigation*, 100(2), 449-458, 1997, Ahmad, F. *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 272(1), 448-457, 1997, Norris, K. *et al.*; *Febs Letters*, 415(3), 243-248, 1997, Li, P. M. *et al.*; *Cellular Signalling*, 8(7), 467-
2 0 473, 1996)。そして、これらの情報に基づき、最近Ahmad, F. らのグループはLARおよびPTP1Bがインスリン抵抗性の治療ターゲットとなり得るかもしれないと報告している (Ahmad, F. *et al.*; *Metabolism, Clinical and Experimental*, 46(10), 1140-1145, 1997)。

現在までのLARおよびCD45等のPTPに関する研究より、細胞内情報伝達
2 5 系においてPTPがPTKと共役して極めて重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.*; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。本発明者らは、これらの状況に鑑み、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに特異性を有し、且つCD45に対して特異性を有しない抗体の作製に着手した。

なお、既知のプロテインチロシンホスファターゼに対する抗体としては、CD45の膜貫通領域からホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体 (Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、これらの抗体がLARや、その他プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して如何なる免疫特異性を有するか否かは不明である。ゆえに、CD45に特異性を有さず、LARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を作製する必要もあった。

結節性甲状腺腫には、甲状腺腫瘍と過形成である腺腫様甲状腺腫がある。腺腫様甲状腺腫は多発結節性であるが、その一部に癌を併発していることが少なくない。結節性甲状腺腫の診断では癌を見逃さないことが重要である。現在、臨床においての甲状腺癌の診断は主に触診、超音波診断、穿刺吸引細胞診および組織切片による診断が行われている。甲状

- 腺腫は良性結節、乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、髓様癌および悪性リンパ腫等に分類され、また甲状腺癌を大きく分類すると分化型甲状腺癌（乳頭癌および濾胞癌）と未分化型甲状腺癌に分類することができる。大半は良性結節でありごくありふれたものであるが、はるかに数が多い良性結節の中から少数の悪性病変を確定的に診断するのは極めて困難である。
- 5 分化型甲状腺癌は手術中疑わしい部位があると切除し顕微鏡下で観察した後、癌であれば甲状腺全部を切除する。また、最初に血液検査、画像診断を行っても的確な診断ができないため、結局のところ組織切除に陥るのが常である。穿刺吸引細胞診も行われるが、組織切片による形態学的観察に比較して、細胞と細胞の結合が破壊されるために確定的な診断が下せない。さらに、ヨードシンチやテクネチウムシンチも確定的な判断材料とならない。癌細胞は正常甲状腺細胞に比べてヨードを取り込みにくい。多くの良性結節は放射性ヨードを取り込むが、放射性ヨードを取り込まずにコールドを示す良性結節も多く存在する。また、ホットを示す結節であっても癌である可能性も存在する。この様に、最終的には組織切片による形態学的診断に委ねられるが、この方法は正常と思われる部位であっても疑わしい場合には組織を切除される場合が存在し、また甲状腺摘出時に声帯を動かす反回神経を傷つける可能性が増大する。
- 10 ゆえに、臨床医あるいは病理医からは組織を切除する以前に正常と癌との区別ができる確定的な診断方法が切に望まれていた。
- 15 20

〔発明の開示〕

- 本発明は、LARのホスファターゼサブユニット、特に細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明によって、LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有、且つ他のプロテインホスファターゼには特異性を有しな
- 25

い抗体が提供される。

前記抗体は、配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるLARの細胞内ドメインに相当するポリペプチドまたはその断片を抗原として調製されるものが好ましく、また免疫特異性の点からモノクローナル

5 抗体であるとよい。

そして、係る抗体は、LARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を免疫原として用いることによって調製することができる。係る融合タンパク質を構成する、その他のタンパク質またはポリペプチド断片として、特にGST（グルタ

10 テオン-S-トランスフェラーゼ）が好適であるが、他にも、ポリヒスチジン（好ましくは6個のヒスチジン）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、プロテインA等を用いてもよい。

尚、ポリヒスチジンをを用いた場合、遺伝子組換え法にて発現させた融合タンパク質を単離精製するためには、ニッケルキレーティング樹脂への吸着を利用することができ、pH変動の他、EDTAまたはイミダゾール物

15 質を添加することによって当該樹脂から解離することができる。CBPを用いた場合、発現させた融合タンパク質はカルモジュリンアフィニティー樹脂を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後EGTAを加えることにより当該樹脂から解離することができる。また、プロテインAを用いた場合、発現させた融合タンパク質はIgGセファロース（例え

20 ば、IgGセファロース6FF）カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後pH変動によって当該樹脂から解離することができる。

さらに前記融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片の別の例として、Xpress、Thioredoxin、c-myc、V5およびHA/c-myc

25 等を挙げることができ、これらをエピトープとして認識することができ

る抗体を用いて、目的とするLARホスファターゼドメインとの融合タンパク質を発現した後に抗原-抗体アフィニティークラムにより単離・精製することができる。

- 5 前記した、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインとを含む融合タンパク質は、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20～30℃にて16～24時間、特に好ましくは、23～25℃にて18時間培養し、その培養液および
- 10 /または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施すればよい。この界面活性剤としては、ド
- 15 デシル硫酸ナトリウム、CHAPS (硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン)、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド (1-0-n-ドデシル-β-D-グルコピラノシル(1-4)α-D-グルコピラノシド)、ノニデット (商品名) P40 (エチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)、n-オクチルグルコシド (1-0-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド)、モノラウリル酸シクロロース、テ
- 20 シット (商品名、ドデシルポリ(エリレングリコールエーテル)n)、トリトン (商品名) X-100 (オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)、ツィーン (商品名) 20 (ポリ(オキシエチレン)n-ソルビタン-モノラウレートレート)、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート [以上、いずれもnは1以上の整数を表す] 等が挙げられる。融合タンパク質を溶出させる場合に、これら
- 25

の界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を、得ることができる。

- 5 このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を取得する場合、抗体のスクリーニングにはLARのホスファターゼサブユニットを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

- 10 本発明のモノクローナル抗体として、例えばマウス/マウスのハイブリドーマにより産生される、約150 kDaの分子量を有する抗体を含むモノクローナル抗体が挙げられる。かかる抗体は、インスリンのシグナル伝達機構のさらなる解明のためのツールとして、またインスリン抵抗性およびNIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療、診断等に応用できる。
- 15 そして、LAR関連分子、例えば、モジュレーター、結合タンパク質などの同定や取得にも本発明の抗体が有用である。

- 20 本発明によってさらに、前記モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系が提供される。このハイブリドーマ細胞系として、本発明者によって1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された、受託番号がFERM BP-6343であるマウス/マウスハイブリドーマ細胞系YU1が挙げられる。

- 25 本発明の抗体は、天然産物由来または全体もしくは部分合成（化学合成、遺伝子組換えによる合成等）された、LARタンパク質ならびに少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片およびポリペプチド（以下、この断片およびポリペプチドを総称して「LAR由来分子」と称する）に対して特

異的な免疫反応性を有する。

さらに本発明は、LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原として前記したようなLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質、好ましくはGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることを特徴とする方法を提供するものである。ここで、GST以外に使用可能な、融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片、その融合タンパク質の精製方法は、前記したとおりである。

- 1 0 また、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインとを含む融合タンパク質は、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20～30℃にて16～24時間、特に好ましくは、23～25℃にて18時間培養し、その培養液および／または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施すればよいことも前述のとおりであり、融合タンパク質を溶出させる場合に、これらの界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を、得ることができる。
- 2 0
- 2 5 このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を調製する方法において、抗体のスクリーニングにはLARのホスファター

ゼサブユニットを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

5 本発明によって、LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法が提供される。この方法は、如上の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドの量を測定する工程を含むことを特徴とする。この方法においてLARまたはLAR由来分子の量を測定するために、前記抗体が、好ましくはイムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される。

1.0 本発明のさらなる特徴において、如上の抗体を用いて被検試料よりLARおよび／またはLAR由来分子を単離し、単離されたLARおよび／またはLAR由来分子の活性を測定する工程を含む定量方法が提供される。かかる方法において、LARおよび／またはLAR由来分子を単離するために、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび
1.5 /または免疫沈降が好適に用いられる。すなわち、前記抗体を結合させた担体に被検試料を接触させて抗原（LAR／LAR由来分子）－抗体間の特異的な相互作用を許容し、次いで担体を洗浄した後、結合されたLAR／LAR由来分子を溶出する工程を含む、カラム法、バッチ法等によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が実施されるとよい。
2.0

本発明の別の特徴において、如上の抗体を用いてLARおよび／またはLAR由来分子を単離する工程を含む、LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法が提供される。この生産方法における目的物の単離は、上記LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法におけると同様に、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が好適に用いられる。
2.5

また、本発明でさらに企図されるのは、LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた *in situ* 免疫組織染色などの技術が採用され、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出するものである。

本発明はさらに、甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体を企図する。この抗体は、LAR分子のみならず、その断片例えば、ホスファターゼドメイン、細胞外ドメイン等を抗原とした抗体であつてよく、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、ペプチド抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR一移植抗体などが含まれる。特に、如上のLARのホスファターゼサブユニットに対する抗体で、甲状腺癌細胞との免疫反応性を有するものが本発明によって提供される。甲状腺癌細胞に対して特異的免疫反応を有するとは、正常の甲状腺細胞や良性腫瘍の甲状腺細胞には殆ど反応せず（正常細胞の約10%以下）、癌化した甲状腺細胞によく反応する（癌細胞の約20%以上）ことを意味する。

従って、この抗体を利用して、甲状腺癌を診断することが可能になり、本発明において甲状腺癌の組織診断方法を企図するものである。この診断方法は、甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料を採取し、前記抗体と当該組織試料との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする。この場合、甲状腺組織試料は、被験者より注射針等を用いた穿刺吸引細胞診により採取した試料でも、また甲状腺の一部を切除、摘出して調製した甲状腺組織切片等のいかなる試料でもよい。穿刺吸引細胞診により採取した試料を用いる診断方法は、被験者に対する侵襲性が低いという点でより好ましい。これ

は、従来の組織形態学的検査に基づく甲状腺癌診断法では、組織を無傷な状態で採取しなければ判定し得ず、そのため侵襲性の高い切開法を余儀なくされていたことに鑑みて本発明により提供される重要な利点である。なお、組織切片を用いた診断においても、従来の方法よりも格段に

5 診断の信頼性が高いので有用である。

前記診断方法において、穿刺吸引細胞診により得られた試料は、本発明の抗体を用いて例えばイムノブロッティング、免疫沈降またはELISA等の、汎用されているin vitroのイムノアッセイによって免疫反応性が評価される。そして、組織切片を試料とした場合、従来の免疫反応を利用した組織染色によって免疫反応性が判定される。

10

さらに本発明は、甲状腺癌の組織診断用組成物であって、上記抗体を含むことを特徴とする組成物を提供する。この組成物を用いて、前記したとおり信頼性の高い甲状腺癌の診断方法を実施することができる。組成物には、本発明の抗体の他に、適宜の賦形剤、担体、緩衝液、抗体を安定化するための薬剤等を配合するとよい。

15

このように、本発明によって、LARが甲状腺癌細胞に特異的に高発現することが判明した。また、実施例に示すように本発明のモノクローナル抗体が甲状腺癌の診断に有用であることも証明された。さらに、本発明のモノクローナル抗体が組織切片を用いた甲状腺癌の診断に有用であり

20 (実施例5、6参照)、また組織をホモジナイズした方法による診断にも有用である(実施例7参照)ことが判明した。以上の結果より、当業者であれば本発明のモノクローナル抗体は種々の細胞診あるいはバイオプシーに有用であることが理解できる。さらに、本発明のモノクローナル抗体のみならず、LAR細胞外ドメインを認識することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および/またはペプチド抗体をも利用

25 することができる。この場合であっても本発明のモノクローナル抗体と

同様に実施できるが、細胞外ドメインの解離による影響を考慮するのが好ましい。

5 本発明によりLARに対する抗体は、甲状腺癌に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能であることが判明した。これらの抗体を用いて、LARまたはその断片との免疫学的な結合に基づき、LARまたはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてLARまたはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりLARまたはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化LARと検体中のLAR
10 またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のLARまたはその断片を測定する競合法を利用して検体中のLARまたはその断片を測定する方法が挙げられる。

15 サンドイッチ法によるLARまたはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とLARまたはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-LARもしくはLAR標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびLARまたはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

20 測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する
25

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

抗体を標識する物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エス

テル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサールまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合

5 させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノージ-

10 -[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用

15 することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン- β -D-ガラクトピラノシド

20 (4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができ、本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの

25 架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて

既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

5 本発明はまた、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化（ターゲッティング）されたことを特徴とするDDS製剤を提供する。

甲状腺癌に関与する遺伝子はこれまでに種々明らかにされてきている。乳頭癌患者の一部でRETやTRK遺伝子のチロシンキナーゼドメインの変異が認められた (Fusco, A. et al. ; Nature, 328, 170-2, 1987)。また
1 0 1 5 したRETの変異は過去に放射線被曝の既往のない乳頭癌患者の3-30%に見られ (Santoro, M. et al. ; J. Clin. Invest., 89, 1517-22, 1992、Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996、Zou, M. et al. ; Cancer, 73, 176-80, 1994)、チェルノブイリ原発事故の際、被曝した子どもおよび小児時代に放射線の外照射を受けた既往のある患者から診断される乳頭癌では、RETの変異は60-80%と高率に見出され (Fugazzola, L. et al. ; Cancer Res., 55, 5617-20, 1995、Klugbauer, S. et al. ; Oncogene, 11, 2459-67, 1995、Nikiforov, Y. E. et al. ; Cancer Res., et al. ; 57, 1690-4, 1997、Bounacer, A. et al. ; Oncogene, 15, 1263-73, 1997)、TRK遺伝子
2 0 2 5 変異の頻度は極めて低い (Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996)。RAS遺伝子の点変異は甲状腺腺腫と

甲状腺濾胞癌において高頻度に見られる。これはRAS遺伝子の点変異は腫瘍発生初期の段階であると考えられている (Fagin, J. A. ; Molecular pathogenesis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 7th ed.

- 5 Philadelphia: Lippincott-Raven, 909-16, 1996, Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995)。TSHや刺激性G蛋白をコードしている遺伝子の活動性変異が一部の甲状腺濾胞癌において報告されている (Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995, Russo, D. et al. ; Oncogene, 11, 1907- 11, 1995)。さらに癌抑制遺伝子である
- 1 0 p53の不活性点変異は分化型甲状腺癌では希であるが、未分化癌では高頻度に認められることも報告されている (Fagin, J. A. et al. ; J. Clin. Invest., 91, 179-84, 1993, Ito, T. et al. ; Cancer Res., 52, 1369-71, 1992)。

- 1 5 これら公知の情報から、甲状腺癌の治療または診断を目的とした核酸を、LARに対する抗体によりターゲッティングされたDDS製剤中に含有させることができる。

- 2 0 また、甲状腺腫瘍細胞の増殖は甲状腺刺激ホルモン(TSH)によって調節されており、甲状腺ホルモン剤投与による甲状腺刺激ホルモン(TSH)分泌の抑制は、再発や生存率を改善することも知られている。ゆえに、TSHの作用を阻害するようなタンパク質、核酸あるいは化合物もDDS製剤中に含有させることができる。

- 2 5 一方、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化されたことを特徴とする本発明のDDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される1以上の物質を含んでいてもよく、かような物質を製剤中に配合することによって、癌化した甲状腺細胞への標

的化能を高めたり、甲状腺癌の治療または診断に用いることが可能となる。

ここで云う核酸としては、宿主細胞において発現可能な蛋白質をコードする核酸、細胞由来遺伝子のアンチセンス核酸、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする遺伝子あるいは転写調節因子の結合部位の配列または類似の配列を有するデコイをコードする核酸、各細胞由来の mRNA を切断するリボザイム、自殺遺伝子等が挙げられる。

アンチセンス核酸とは、複製、転写、翻訳等の遺伝子発現のある段階において、将来発現されうる核酸配列に対して特異的に結合する核酸もしくは核酸配列を示し、結果として将来発現されうる核酸配列の発現を阻害するものである。アンチセンス核酸には三重鎖によるアンチジーン核酸も含まれる。デコイをコードする核酸とは、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする核酸あるいは転写調節因子の結合部位の配列または類似の配列を有する核酸を示し、これらを、囹として細胞内に導入することで、転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、転写調節因子の作用を抑制し、最終的には活性化される遺伝子群を抑制することができる可能性がある。本明細書で言うリボザイムとは特定の蛋白質の mRNA を切断するものをいい、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものを言う。リボザイムは特定の蛋白質をコードする遺伝子配列より設計可能であり、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピンリボザイム、デルタ型リボザイムなどのリボザイムの種類に関わらず、特定の蛋白質の mRNA を切断するもので、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものであれば本明細書で言うリボザイムに含まれる。本明細書で言う自殺遺伝子とは、プログラム細胞死誘発遺伝子、アポトーシス誘発遺伝子、ネクローシス誘発遺伝子等を含有し、結果的に細胞を死に導く遺伝子を言う。

これら核酸は当業者により適宜選択することができ、該核酸をDDS製剤に含有させることにより、甲状腺癌細胞特異的に細胞を死滅させることができる。

5 放射性ヨード(^{131}I)を添加することによって、正常甲状腺細胞が破壊され、従って、全身放射性ヨードシンチ検査での癌転移が検出しやすくなる。また、血中サイログロブリン値を測定することにより、癌の取り残しや再発が確認できる。さらに、放射性ヨード治療は潜在性の癌を破壊することにより再発を防止することができ、治療のために大量の放射性ヨードを使用することで、全身放射性ヨードシンチ検査を可能にする。

10 この検査は癌の取り残しを見つけるのに大変感度がよい。ゆえに、本発明の抗体またはヨード標識あるいは放射性ヨード標識された抗体を用いることによりさらに診断・治療における有用性が高まる。

また、タンパク質としては、抗体、TSH（甲状腺刺激ホルモン）および甲状腺ホルモン等が挙げられる。

15 上記したとおりの構成成分を含む前記DDS製剤は、甲状腺癌の診断用医薬組成物や、甲状腺癌の治療用医薬組成物として有用である。

さらに、本発明の医薬組成物は、甲状腺癌を化学療法剤を用いて治療することが意図される場合に、化学療法剤とLARに対する抗体を組合せ、この抗体が特異的免疫反応性に基づき甲状腺癌に結合することを利用し

20 て病変部位へ薬物を濃縮させ、副作用の少ない有効な化学療法を実施することを可能とするものである。

ここで甲状腺癌治療に有効な化学療法剤として、シクロフォスファミド、アドリアマイシン、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル、ダカルバジンおよびビンクリスチン等の抗癌剤を用いることができる。

25 前記医薬組成物の投与方法は、全身投与あるいは局所投与のいずれでもよい。全身投与として、経口投与、静脈内投与、皮下、筋肉注射およ

び直腸投与等があり、局所投与として、甲状腺組織内への直接投与もしくは甲状腺組織に連絡している血管内に投与することが好ましい。

本発明の医薬組成物の投与量は、薬物の公知の有効血中濃度に依存し、当業者が適宜選択するところである。また、以下に示すリボソーム製剤の場合、抗体の量はリボソームが形成するのを妨げない量を用いることが重要である。

なお、DDS製剤に含有せしめられる抗体は、特にヒトに投与する場合、前記示したヒト化抗体もしくはキメラ抗体等のヒトに対して免疫原性を有さないあるいは極力抑えた抗体を用いるのが好ましい。マウスモノクローナル抗体をヒトの体内に投与すると、ヒトにとっては異種タンパクであるので種々の副作用が起こる危険性がある。そこで、ヒトモノクローナル抗体が望ましいが、融合効率が悪くまた抗体産生が安定なハイブリドーマを得ることは難しかった。しかし、現在技術は進歩しヒトモノクローナル抗体またはキメラ抗体を作製することが可能となっている。

キメラ抗体とはマウス抗体とヒト抗体のキメラ分子をいう。ヒトに任意の抗原を免疫して抗体を製造することは倫理上不可能である。ゆえに、マウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（V領域）を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部（C領域）遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させれば、ヒト・マウス・モノクローナル抗体が産生できる。キメラ抗体はヒトに対する抗原性が少ないため、ヒト体内に投与する治療用や画像診断用モノクローナル抗体等として利用できる。公知のキメラ抗体の関連技術として、特開平05-304989号、特開平04-330295号、W09106649、特開昭63-036786号、特公平06-98021号等がある。

しかし、最近キメラ抗体よりも有用であるといわれるヒト化抗体が開

発された。ヒト化抗体とは抗体分子の抗原結合部位（CDR：Complementary determining region、相補性決定領域）の遺伝子配列のみをヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトニング）し、抗体分子のCDRを除いた全分子をヒト化した抗体である。本抗体はヒト・マウス・キメラ抗体より、マウスの抗体部分が少ないため、抗原性が少なく安全性が高いと言われている。我が国では現在、成人性T細胞白血病に対するヒト化抗体の臨床試験が行われている。ヒト化抗体の製造方法およびその関連技術については、米国Genentech社（W09222653、W09845332、W09404679、W09837200、W09404679、）および英国Celltech社（W09429451、によるW09429351、W09413805、W09306231、W09201059、W09116927、W09116928、W09109967、W08901974、W08901783）等の特許出願がある。

ヒトモノクローナル抗体の作製方法には細胞融合法以外にも、エプスタイン・バー（Epstein-Barr）ウイルス（EBV）で形質転換する方法、さらにはその形質転換した細胞を親細胞と融合させる方法、遺伝子工学を利用しキメラ抗体、ヒト化抗体を作製する方法などがある。キメラ抗体とは異種の動物の免疫グロブリン遺伝子断片をつなげて作製された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスなどにヒトにとって異種の抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部（CDR）以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置換し他抗体をいう。ヒトモノクローナル抗体作製の親細胞は、ヒト／マウスのヘテロミエローマであるSHM-D 33株（ATCC CRL 1668）またはRF-S1株を用いるとマウスの親細胞と同等の高い融合効率が得られる。これらの親細胞を用いて得られたハイブリドーマはフィーダー細胞なしでクローニングが可能であり、IgGタイプの抗体を比較的安定にしかも大量に産生することができる。親細胞の培養には、15%FCSを加えたERDF培地を用い、その他の操作はマウスの場合と同様である。また、IgGタイプのヒトモノクローナル抗体を作製するには抗原で充分

に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。
十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合にはin vitroで抗原感作を行うこともできる。

上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

また、そのような抗体をヨードで放射標識するあるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、診断・治療薬として有用性が増す場合がある。

乳頭癌や濾胞癌が一度血流に乗って周囲の組織、または離れた部位(特に肺と骨)に転移した場合、腫瘍を破壊するために放射性ヨード($^{131}\text{-I}$)を投与するのが一般的な治療となっている。正常甲状腺細胞は血液からヨードを取り込み濃縮する。そしてこの過程は下垂体からのTSH(甲状腺刺激ホルモン)により刺激される。その後ヨードは甲状腺ホルモン(サイロキシンT4)を作るのに使われる。上記述べたように、甲状腺癌または甲状腺癌が転移したものは、正常な場合はごくわずかの量のヨード(または放射性ヨード)しか取り込まない。しかし、大量のTSHの影響下にある時は、甲状腺癌、またはその転移したものの一部は刺激を受けて、相当量のヨードを取り込むようになる。これにより、周囲の組織を損なうことなく、癌に直接大量の放射線が照射されることになる。甲状腺が存在しており、正常な量の甲状腺ホルモンを産生している場合は、下垂体のTSHの産生量は比較的低いままに留まっているが、甲状腺全体が取り除かれたり、破壊されたりして甲状腺ホルモンのレベルが下がると下垂体はTSHの分泌を急激に増加する。このTSHが甲状腺癌を刺激し、放射性ヨードを取り込むようにする。広がった甲状腺癌に対し、放射性ヨード療法を行なう場合は、甲状腺全体を手術でほぼ完全に切り除き、残留した組織を放射性ヨードを使って破壊する必要がある。一度これを行なったら

、首に腫瘍が残っているか、離れた場所に転移があることがわかっている患者には、TSHのレベルが十分に高ければ、試験量の放射性ヨード(通常は約2から10ミリキュリー)を使ってスキャンを行う。もし、相当量のヨードが甲状腺癌の領域に集まっていれば、さらに大量の治療量の放射性ヨード(通常100-200ミリキュリー: 3700から7400MBq)を与え、腫瘍の破壊を試みる。より浸潤性の強い甲状腺癌のある患者に対しても、放射性ヨードが安全で有効であるため、多くの医師がそれ程浸潤性の強くない乳頭癌や濾胞癌にも、放射性ヨードを日常的に使うようになっている。

10 ゆえに、LARに結合する抗体をヨード標識する、あるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、さらに甲状腺癌細胞への特異性を増強し、治療または診断に用いることができる。

この様に甲状腺癌細胞を特異的に認識する抗LAR抗体はドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System: DDS)においても有用である。ドラッグデリバリーシステム(橋田充; ドラッグデリバリーシステム 創薬と治療への新たな挑戦, 化学同人(1995))は、薬物の投与方法や形態を工夫し、体内での薬物動態を制御することにより薬物を標的部位に選択的に送り込み、結果として最適の治療効果を得、さらに薬物による副作用を最小限にとどめることを目的とした薬物投与に関する新しい技術である。

20 ある。現在までに様々な DDS製剤が開発されているが、なかでもリポソーム製剤(寺田弘, 吉村哲朗編; ライフサイエンスにおけるリポソーム実験マニュアルシュプリンガー・フェアラーク東京(1992))は欠損酵素の補充、制癌剤および抗生物質の投与、さらには遺伝子治療の分野においても脚光を浴びている。

リポソームは生体膜を構成しているリン脂質を基本とする脂質二重層

からなる閉鎖型小胞体であり、安全性が高く、脂質膜と水層の部分から構成されているため、脂溶性・水溶性を問わず様々な薬物を内包することができるという、優れた薬物キャリアーとしての機能を有している事が知られている。

- 5 さらに、リボソームの表面に抗体やペプチド等を結合することでターゲティング能を付与できることは公知の事実である (Kazuo Maruyama, Tomoko Takizawa, Motoharu Iwatsuru et al. ; Biochimica et Biophysica Acta 1234, 74 (1995)) (Jlbao Zhao, Shunsaku Kimura, Yukio Imanishi ; Biochimica et Biophysica Acts 1283, 37 (1996))。
- 1 0 すなわち、抗LAR抗体は様々なリボソーム製剤における甲状腺癌細胞への特異性を高める目的で使用され得る。さらに脂質の種類を変化させたり、ポリエチレングリコール等で修飾することにより、温度感受性リボソーム (Sakae Unezaki, Kazuo Maruyama, Motoharu Iwatsuru et al. ; Pharmaceutical Research 11, 1180 (1994))、血中安定性リボソーム (1 5 Kazuo Maruyama, Tsutomu Yuda, Motoharu Iwatsuru et al. ; Biochimica et Biophysica Acta 1128, 44 (1992))、プラスミド導入ベクターとしてのカチオニックリボソーム (Xlang Gao, Daniel Jaffurs, Leaf Huang et al. ; Biochemical and Biophysical Research Communications 200, 1201 (1994)) 等、種々の性質の異なるキャリア (2 0 ベクター) を作製できるという特性を有している。

しかしながら、通常、リボソームはエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、細胞膜近傍の初期エンドソーム内に取り込まれる。その後、細胞深部の後期エンドソームに送られ、そして最終的にはライソソームへと運ばれる。ライソソームへ運ばれたリボソームは加水分解 2 5 酵素の作用により分解され、同時にリボソーム内に封入された薬物等も代謝されるため、薬物などが未変化体の状態で細胞質内に到達する割合

が極端に低下するという問題があった。

現在では細胞のバリアーである細胞膜に障害を与えることなく細胞質に直接薬物等を導入する方法が検討されている。例えば、リポソームが膜融合能を獲得すればライソゾームを経由することなく、直接薬物等を細胞質ゾルまで送達することが可能となる。これまでに、リポソームを細胞へ融合させる方法として pH感受性リポソーム(Kenji Kono, Ken-ichi Zenitani, Toru Takabishi; Biochimica et Biophysica Acta 1193, 1(1994))およびウィルスのエンベロープ蛋白質をリポソームに組み込んだ再構成リポソーム(Sangeeta Bagai, Debi P. Sarkar; The Journal of Biological Chemistry 269, 1966(1994))で検討されている。

最近、センダイウイルス(sendai virus : hemagglutinating virus of japan)(Yoshio Okada; Current topics in Membranes and Transport 32, 297 (1988))の膜融合能をリポソームに付与した膜融合リポソーム(fusogenic liposome : HVJ-liposome)が報告されている。センダイウイルス(HVJ)は細胞間融合現象(Y. Maeda, J. Kim, Y. Okada et al; Experimental Cell Research 108, 108 (1977))が認められたことから、動物細胞を用いた遺伝学の先駆けになったウイルスである。さらに、HVJはリポソームとも融合することができ(Mahito Nakanishi, Tsuyoshi Uchida, Yoshio Okada et al.; Experimental Cell Research 159, 399 (1985))、その融合体(HVJ-リポソーム)はさらに細胞膜と融合する。つまり、リポソームと HVJを直接反応させて作製した HVJ-リポソームはいわゆるハイブリッドベクターであり、内部にリポソーム由来の空洞を有し、外側はウィルスエンベロープと同じスパイク構造を有している。HVJ-リポソームは蛋白質、化学物質および遺伝子等、リポソーム内に封入できるものであればあらゆる物質をセンダイウイルスと同等の高

い効率で細胞内に導入することができる。(Tetsuhiko Nakagawa, Hiriyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi; Drug Delivery System 11, 411 (1996))。また、例えば HVJ-リポソームの改良型として、DNA結合能を有する核蛋白質である HMG-1(Non-histone chromosomal protein, High Mobility Group-1)を DNAと共導入することにより、さらに導入効率が向上するという報告もある(Yasufumi Kaneda et al.; J. Molec. Medicine 73, 289 (1995))。

膜融合リポソームの別の例として、VSV(Vesicular Stomatitis Virus: 水疱性口内炎ウィルス)(永井美之, 石浜明監; ウィルス実験プロトコール, Medical View(1995))を利用したリポソーム製剤も利用できる(J. Virol., 72(7), 6159-63, 1998, Exp. Cell. Res., 200(2), 333-8, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(7), 2448-51, 1990, Biochim. Biophys. Acta, 987(1), 15-20, 1989)。VSVはラブドウィルスのベシクロウィルス属に属する(一)単鎖 RNA型ウィルスで、膜表面にエンベロープ蛋白質である G蛋白質を有している(Akihiko Kawai; Journal of Virology 24, 826 (1977))。VSVの細胞への感染機構はリポソームと同様、エンドサイトーシス経路により行われる。しかし、VSVはリポソームとは異なり、エンドソーム膜と融合する特性を有しているため、ライソゾーム内の加水分解酵素による分解を受けることなく、自身の遺伝子を細胞質内に導入している。これまでに、VSVが膜融合能を有し、ヒト赤血球に対して溶血作用を示さないことが知られている(Carole A. Bailey, Douglas K. Miller, John Lenard; Virology 133, 111(1984))。また、VSVは多くの組織細胞に普遍的に存在するフォスファチジルセリンを受容体とするため、宿主域が広く(Michael J. Clague, Christian Schoch, Robert Blumenthal; Biochemistry 29, 1303 (1990))、さらにウィルス増殖が速いことから大量のウィルスが採

取できるという特徴を有している。一方、VSVとリボソームが融合することが報告されている (Satoshi Yamada, Shunichi Ohnishi; Biochemistry 25, 3703 (1986))。

5 この様に、抗LAR抗体は膜融合リボソーム、pH感受性リボソーム、再構成リボソーム、カチオニックリボソーム等またはこれらを修飾したあらゆるリボソーム製剤のターゲッティング能を高める目的で利用することができる。

その他、モノクローナル抗体を用いてターゲッティング能を高める方法およびその有用性が多数報告されており (Hum. Antibodies, 9(1), 1 0 61-5, 1999、J. Clin. Pharm. Ther., 22(1), 7-19, 1997、J. Int. Med. Res., 25(1), 14-23, 1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (24), 14164-9, 1996、Hepatology, 22(5), 1482-7, 1995、Hepatology, 22(5), 1527-37, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(15), 6986-90, 1995、Immunomethods, 4(3), 259-72, 1994、J. Drug Target 1 5 , 2(4), 323-31, 1994、Cancer Res., 57(10), 1922-8, 1997、Crit. Rev. Biotechnol., 17(2), 149-69, 1997、Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 16(7), 505-12, 1994、Trends Biotechnol., 12(6), 234-9, 1994、Bioconjug. Chem., 4(1), 94-102, 1993)、甲状腺癌の治療において前記記載した文献あるいは公知の技術に準じてLARに対する

2 0 モノクローナル抗体が利用できる。

その他、ウイルスベクターによる遺伝子治療や、ポリ酸・グリコール酸マイクロスフェア、リピッドマイクロスフェア、ポリエチレングリコール修飾酵素等を用いたDDS製剤においても本発明の抗LAR抗体を利用し、甲状腺癌への標的化を図ることができる。

2 5 さらに別の実施態様として、甲状腺癌細胞においてLARが高発現しているということは、LAR分子をコードする核酸配列から高率にmRNAへの

転写が行われ、翻訳されているものと理解できる。ゆえに、当業者であればmRNAに対するプローブを用いることによりLAR mRNAの発現量を測定することにより癌の診断を行うことは容易である。

- 5 また、本発明の結果、甲状腺癌細胞において該転写を促進させる転写因子、プロモーター、エンハンサー等の分子生物学的研究に多大な貢献をすることができる。

〔図面の簡単な説明〕

- 1 0 第1図は、LARのサブユニット構造を示す模式図(a)、および実験例にて調製したLARの膜内ホスファターゼドメイン構造の変異体を示す模式図(b)である。

第2図は、LAR C/Sとインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞において、インスリン刺激により誘導されるチロシンリン酸化の時間経過を示すイムノプロットを表す図である。

- 1 5 第3図は、LARの野生型または変異体とインスリンレセプターの野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞における、リン酸化・脱リン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

第4図は、LARの野生型または変異体によるインスリンレセプターβ鎖の脱リン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

- 2 0 第5図は、インスリンレセプターの野生型または変異型とLAR C/SとをコトランスフェクトしたCOS細胞におけるチロシンリン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

第6図は、本発明の抗体YU1の分子量を示す、SDS-ポリアクリルアミドゲルを表す図である。

- 2 5 第7図は、本発明の抗体YU1のLARに対する免疫特異性を示すイムノプロットを表す図である。

第8図は、インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化を示すイムノブロットを表す図である。

- 5 第9図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

第10図は、本発明の抗体YU1を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べたイムノブロッティングの結果を示す図である。

第11～13図は、本発明の抗体YU1を用いたヒト甲状腺癌組織切片の免疫染色における、癌化細胞の選択的染色結果を示す図である。

- 10 第14図は、本発明の抗体YU1のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常および癌化甲状腺組織のイムノブロッティングの結果を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

- 15 [実験例1] LAR変異体によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化ならびにLARとインスリンレセプターとの会合に関する検討

まず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするために、LARのPTPドメインの触媒活性中心に存在するシステインをセリンに変換することにより作製した、変異型 LARを用いるというスト

- 20 ラテジーにより解析を進めた。

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

LAR発現ベクターとして、(a) LAR WT：ヒト野生型LAR (配列番号：3)
、(b) LAR C/S：LAR-PTPドメイン 1の活性中心にあるシステイン (配列番号：3のアミノ酸第1522位) を、配列番号：3のヌクレオチド第4983位
25 のGをCに置換することによりセリンへと変換したもの、ならびに(c)
LAR DC/S：LAR C/Sにおける変異に加えて、さらにLAR-PTPドメイン 2の

システイン（配列番号：3のアミノ酸第1813位）を、配列番号：3のヌクレオチド第5856位のGをCに置換することによりセリンへと変換したものの3種（第1図(b)参照）を、pMT発現ベクターに組み込んだもの（Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992およびStreuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990を参照）を用いた。

一方、インスリンレセプターの発現ベクターは、(a) IR WT：野生型、および(b) IR K1018M：野生型のインスリンレセプターのATP結合部位の、第1018位のリジンをメチオニンに変換してチロシンキナーゼ活性を欠失させたインスリンレセプター変異型の2種類の cDNAを、SR α プロモーターの下流に組み込んだもの（Kanai F. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195, 762-768, 1993を参照）を用いた。

b. COS-7細胞へのトランスフェクション

COS-7細胞を 1.0×10^6 細胞数/8 mL/90 ϕ ディッシュとなるように10%牛胎児血清添加 RPMI 1640培地（日水製薬株式会社）に播種して16時間培養を行った後、LAR C/Sと IR WTの発現ベクターを DEAE-デキストラン法を用いて COS-7細胞にコトランスフェクションした。用いたLAR C/Sは前記①(b)に記載のとおりに変異させることにより、*In vitro*でチロシンホスファターゼ活性が完全に欠失していることが明らかにされている（Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990）ものである。

コトランスフェクションは、以下の手順に従って行った。まず2% FCS を含有する RPMI 1640 培養液（グルタミン0.3 gおよびカナマイシン0.1 gを含む、RPMI 1640培地（日水製薬株式会社）10.2 g/L、10% NaHCO₃でpH 7.4に調整）4 ml に、40 μ lの10 mM クロロキンを加えた。この溶液2 ml に、LAR 発現ベクター5 μ gおよび IR 発現ベクター1 μ gを加え、残りの溶液2 ml には16 μ l の100 mg/ml DEAE-デキストランを

加えた。次いで双方の溶液をよく攪拌混合した。こうして調製した発現ベクター溶液 3.75 ml を、 1.0×10^6 細胞数/8 ml/ディッシュ となるように播種し、37 °C、5%CO₂インキュベーター内で 16 時間前培養しておいた COS-7細胞に加えた。前培養と同様の条件で4 時間培養した後に10
5 % DMSO溶液で 2 分間処理し、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) で洗浄後、10% FCS を含有する RPMI 1640 を8 ml 加え、37 °C、5% CO₂ に調整したインキュベーター内で 48時間培養した。

c. インスリン刺激と細胞溶解液調製

- 1 0 トランスフェクション終了後のCOS-7細胞を血清無添加RPMI 1640 培養液中で16時間培養し、 10^{-7} Mインスリン (生化学工業社製) で一定時間すなわち、0、1、5、15および 30分間の刺激を行った。但し 0分刺激とは、インスリン刺激を行ったが、氷上に放置し、37°Cでインキュベートしなかったものである。インシュリン刺激開始より各時間経過後に、培養液をすべて吸い取り、直ちに PBS w/Inh. (チロシンホスファターゼイ
1 5 ンヒビター含有PBS: 1 mM バナジウム酸ナトリウム、5 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、5 mM EDTA · 2Na、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.4 mM KH₂PO₄) を5 ml 加えた。PBS w/Inh. で細胞全体を洗浄してから液体を吸引除去し、細胞に溶解用
2 0 バッファー (1% Nonidet P-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、5 mM EDTA、10 mM ヨードアセタミド、10 mMフッ化ナトリウム、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.4 mM バナジウム酸ナトリウム、0.1 mM 酸化フェニルアルシン、1 mM ベンズアミジン、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル) を1ml 加え、セルスクレイパーを用いて細胞を
2 5 集めた。この細胞懸濁液を 1.5 mlチューブに移し 4 °Cで 30 分間インキュベートすることにより、細胞を完全に溶解させた。インキュベート

後の液体を12,000 rpm、4 °Cにて10 分間遠心分離して得られた上清を、細胞溶解液として以下の実験に用いた。

d. 免疫沈降

c. で得られた細胞溶解液につき、抗 LAR E-サブユニット抗体 (7.5
5 μ gの11.1Aと7.5 μ gの753.Aとの混合物 (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*,
11, 897-907, 1992参照) を用いた免疫沈降を行った。前記細胞溶解液
1 ml に対してモックとしてMOPC 21 (マウスIgG1 κ : Sigma社製) を15
 μ g加え、4 °Cで1 時間インキュベート後、 γ -bind (GammaBind Plus
Sepharose : Pharmacia Biotech社製) 20 μ lを加え、さらに 4 °Cで 1
1 0 時間インキュベートすることにより前吸収を行った。4 °C、12,000 rpm
にて10 分間遠心分離を行い、上清 950 μ lを別のチューブに移した。抗
LAR E-サブユニット抗体を15 μ g 加え、4 °Cで1 時間インキュベート後
、 γ -bind を20 μ l加え、さらに 4 °Cで1 時間インキュベートした。
12,000 rpm、4 °Cにて10 分間遠心分離後、沈査を 1 ml 溶解用バッファ
1 5 ーで2回、PBS w/Inh. で1 回洗浄し、20 μ l のSDSサンプルバッファーに
懸濁した。これを沸騰水中で 5分加熱し、電気泳動用の検体とした。

e. イムノブロッティング

上記検体を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した
後、トランスファー装置を用いて400 mAで4 時間ニトロセルロース膜
2 0 (Schleicher & Schuell) に転写した。この膜を3% ウシ血清アルブミ
ン溶液中において室温で 30 分間以上インキュベートすることによりブ
ロッキングを行った。充分量の TBS-T (Tween 20含有TBS : 10 mM Tris-
HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で10 分間、2 回以上洗
浄後、TBS-T で50,000倍に希釈した抗リン酸化チロシン抗体 (4G10、
2 5 UBI社)、抗LAR E-サブユニット抗体または抗インスリンレセプター β 鎖
抗体 (UBI社) を加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-Tで

- 5 分間、3 回以上洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（西洋ワサビペル
オキシダーゼ標識抗マウス IgG : Santa Cruz Biotechnology社製） 1.5
ml を含むTBS-T溶液を15 ml 加え、室温において1 時間振盪した。充分
量の TBS-T で5 分間、3 回以上洗浄後、発光試薬セット（和光純薬工業
5 株式会社製）を用いてケミルミネッセンス法により、各抗体と結合する
蛋白質のバンドを検出した。

f. 結果

- 1 0 このように、LAR C/SとIR WTをCOS-7細胞にコトランスフェクションし
インスリンで一定時間刺激した後に作製した細胞溶解液を抗 LAR E-サブ
ユニット抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッテ
ィングを行ったところ、インスリン刺激 1分でインスリンレセプターβ
鎖のチロシンリン酸化および 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認めら
れた。これらのチロシンリン酸化は、インスリン刺激後 30分においても
持続して認められた（第2図A参照）。

- 1 5 また、抗 LAR E-サブユニット抗体（第2図B）、抗インスリンレセプ
ターβ鎖抗体（第2図C）および抗リン酸化チロシン抗体（第2図A）
を用いたイムノブロッティングの結果、LARとインスリンレセプターがイ
ンスリンレセプターのチロシンリン酸化の有無により会合することも明
らかとなった。

2 0

〔実験例2〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸
化の検討（1）

- 2 5 次に、LAR WT、LAR C/SおよびLAR DC/Sと IR WTを用いて同様に COS-
7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで 5分間刺激後、抗
LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、沈降物について各種抗体を用い
たイムノブロッティングを行った。その結果、インスリンレセプターと

LAR WTをコトランスフェクションしたものは LAR C/SやLAR DC/Sをコトランスフェクションしたものと比べると、インスリンレセプター β 鎖や 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化はほとんど検出されなかった（第3図A参照）。

- 5 また、この実験において LAR（第3図C）やインスリンレセプター（第3図D）の発現量は、それぞれのトランスフェクタントにおいてほぼ同一であったことより、LAR WTはインスリンレセプター β 鎖や85 kDa蛋白質のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが示された。

- 10 また、抗 LAR E-サブユニット抗体による免疫沈降物を抗インスリンレセプター β 鎖抗体でイムノブロッティングしたところ、LAR DC/Sをコトランスフェクションしたものでは LAR WTや LAR C/Sをコトランスフェクションしたものに比較すると、インスリンレセプター β 鎖のバンドが明らかに弱かった（第3図B）。

- 15 この結果は、LAR WTや LAR C/Sに比べて、LAR DC/Sとインスリンレセプターの会合が弱いことを示すものである。LAR C/Sと LAR DC/Sの違いは、ホスファターゼドメイン 2の1813番目のアミノ酸のみであることから、チロシンホスファターゼ活性を示さず基質との結合に関与すると推測されてきたこのドメイン 2が、LARとインスリンレセプターとの結合に機能していることが明らかとなった。

20

〔実験例3〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討（2）

- 25 さらに、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化がLARに結合したもののみであるのか、またはインスリンレセプター全てで確認されるのかを検討するために、このコトランスフェクタントの細胞溶解液を電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った。そ

の結果、LAR WTを導入したもののみ、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化が顕著に認められた（第4図参照）。

【実験例4】LAR C/S存在下でのインスリンレセプターのチロシンリン酸化

5 化の検討

次に、85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化がインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性によるものであるかを明らかにするため、LAR C/SとIR WTまたはインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性を欠失させたIR K1018M (IR MT) を COS-7細胞にコトランスフェクションした。5分間インスリン刺激を行った後、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った（第5図参照）。その結果、IR WTとコトランスフェクションしたものではインスリン刺激によりインスリンレセプターβ鎖および85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められたが、IR K1018Mとコトランスフェクションしたものではこれらのリン酸化が全く認められなかった。

以上の結果より、インスリンがインスリンレセプターに結合するとインスリンレセプターのβ鎖の速やかなチロシンリン酸化が起こり、さらにインスリンレセプターチロシンキナーゼが85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

従って、この85 kDa蛋白質は、インスリンレセプターと結合していることが確認された LARの P-サブユニットである可能性が考えられた。

【実施例1】LARのP-サブユニットの細胞内ドメインに対する抗体の作製

以下の手順に従って、LARの細胞内ドメインに対する抗体を作製した。

2 5 a. 免疫原の調製

免疫原として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-LAR融合蛋白質

(GST-LAR) を用いることとした。LAR P-サブユニットの細胞膜貫通部分の終点より細胞質側すべてにあたる 607 アミノ酸 に相当するcDNA (配列番号: 1、3467塩基対) をpGEX-2T ベクター (Pharmacia Biotech社製) のBamHI/EcoRIサイトに組み込んだ発現ベクターを用いて

5 常法に従い *E. coli* AD202 を形質転換した。この大腸菌を LB (Amp. +) 寒天培地 (アガー7.5 gを含む後述のLB (Amp. +) 培地) で一晩培養した後、シングルコロニーをLB (Amp. +) 培地 (トリプトン10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L、5 N NaOH 0.2 ml/L、アンピシリンを 50 μ g / ml含有) 50 ml に接種し、さらに一晩培養した。これをLB(Amp.

1 0 +) 培地 500 mlに接種し、37°C で 600 nm における吸光度が約 1.0 になるまで培養し、1 M IPTG (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド、和光純薬工業社製) 50 μ l を加え、25°C で一晩培養した。この培養物を 3,000 rpm、4°C で15 分間遠心分離し、沈殿した菌体を NETN (0.5 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM

1 5 NaCl) 50 ml に懸濁させた。その後、1 分間 超音波処理、氷上 1 分間の操作を 2 回繰り返す、14,000 rpm、4°C で20 分間遠心分離して上清を得た。この大腸菌溶解液 10 ml に グルタチオンセファロースビーズ懸濁液 (Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech社製) を NETNで3 回洗浄し、50%NETN懸濁液として調製) を 100 μ l 加え、室温

2 0 で 30 分間インキュベートした。得られた懸濁液を3,000 rpm、4°C で5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿したグルタチオンセファロースビーズをNETNで 2 回、PBSで 1 回 洗浄し、SDS sampleバッファー (125 mM Tris-HCl pH 6.8、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、5% 2-メルカプトエタノール) を100 μ l 加え、沸騰水中で10 分間加熱して

2 5 GST-LAR融合蛋白質を溶出した。ビーズを除いた溶出液を、Centricon-10 (アミコン社製) に移し、3,000 rpm、45分間、4°C で遠心濃縮した。

緩衝化を目的として1 ml のPBSを加え、ふたたび 3,000 rpm、45分間、4°Cで遠心濃縮した。この緩衝化の操作をさらに 2 回繰り返して得られたものを、免疫用の抗原溶液とした。抗原蛋白質の精製および濃縮は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

- 5 一方、最終免疫では静脈内投与を行うため、上記とは異なる方法で抗原溶液を調製した。GST-LAR融合蛋白質を発現している前記大腸菌溶解液とグルタチオンセファロースビーズをインキュベートし、遠心分離後、沈殿したビーズを NETNで2回、PBSで3回洗浄した。次いで GSH 溶出バッファ（20 mM グルタチオン、1M Tris-HCl、pH 9.6）を100 μ l 加え、
- 10 10分間室温で軽く攪拌して GST-LARを溶出させた。3,000 rpm、4°C で5分間遠心分離して上清を回収する操作を計 3 回行い、全溶出液を生理食塩水中 4°C で2日間透析したものを、静脈内投与用抗原溶液とした。

b. 免疫処置

- 6週齢の雌性 Balb/c マウス 8 匹に対し、プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、Sigma社製)を 0.5 ml/匹で腹腔内投与した。2
- 15 週間後、腹腔内免疫用抗原溶液をフロイント完全アジュバント（GIBCO社製）と 1 : 1 で混和しエマルジョン化したものを、GST-LAR融合蛋白質が約10 μ g/匹となるよう腹腔内投与した。以後、ほぼ2週間ごとに4回、腹腔内免疫用抗原溶液とフロイント不完全アジュバント（GIBCO社製）と
- 20 の 1 : 1 混和物をGST-LAR が約 30~70 μ g/匹となるよう調製し、腹腔内投与した。4 回目の免疫の4日後に眼底静脈より採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定した。

c. ELISA

- 25 静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製した GST-LAR および GSTのみの蛋白質溶液を、それぞれ精製水に対して 4°C で一晩透析した。これを、PBS で 0.5 μ g / ml に調製し、50 μ l / ウェルで ELISAプレート

- (Falcon 3911 MicroTestTM Flexible Assay Plate) に1時間吸着させた。洗浄用バッファー (0.05% Tween20 を含む PBS) で5回洗浄後、5%スキムミルク (2.5 gのスキムミルクを 50 ml の PBS に溶解して調製) でブロッキングを行った。これを洗浄後、bで得られた血清を血清
- 5 希釈用バッファー (0.25% BSA を含む PBS) で16,000倍に希釈し、50 μ l/ウェルずつ加え、湿箱中1時間インキュベートした。プレートを洗浄後、1000 倍希釈 HRP標識抗マウスIgG抗体を50 μ l/ウェルずつ加え1 時間インキュベートした。洗浄用バッファーで 4 回、PBS で1回 洗浄後、o-フェニレンジアミン (和光純薬工業社製) をクエン酸緩衝液
- 1 0 (5.6325 g クエン酸一水和物、18.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を精製水に溶解し、500 mlとして調製) に 1 mg /mlの濃度で溶解させた基質溶液を 50 μ l/ウェルとなるように加え、30 分間反応させた後、50 μ l の 10% H_2SO_4 を加え反応を停止した。このうち 50 μ l を測定用 96ウェルプレート (住友ベークライト社製) に移して450 nm の吸光度を測定した。

1 5 d. 細胞融合

上記ELISAの結果よりGST-LARに対する抗体価の上昇が認められたマウス2匹に静脈内投与により最終免疫を行い、その3日後に脾臓を摘出して常法により脾細胞を調製した。

- 細胞融合のためのparent cellは、事前に 20 μ g / mlの 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル
- 2 0 転スフェラーゼ (HGPRT) 欠損株であることを確認したBalb/c マウス由来ミニローマ細胞株 NS1 を用いた。NS1細胞 2×10^7 細胞数と 脾細胞 1×10^8 細胞数に対し、ClonaCell (商標名) - HY Hybridoma Cloning Kit (StemCell Technologies Inc.) を用いて細胞融合、HAT
- 2 5 選択およびクローニングを行った。

クローニングされたハイブリドーマ培養上清のスクリーニングは、静

脈内免疫用抗原と同様の方法で調製したGST、GST-LARまたは GST-CD45 (Furukawa, T. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10928-10932, 1994)) の蛋白質溶液0.5 μ g/mlを結合させたプレートにて、ハイブリドーマ培養上清50 μ lについて前記cにおける ELISA法に準じて行った。このELISA法において、GSTまたはGST-CD45を結合させたウェルには免疫反応を示さず、GST-LARを結合させたウェルのみに免疫反応を示すハイブリドーマを選択した。なお、クローニングされたハイブリドーマの継代培養は、10% ウシ胎児血清 (GIBCO社製) を含有するRPMI 1640 培養液 (日水製薬社製) で行った。

10 このように、HAT選択されたハイブリドーマの培養上清を ELISA法によりスクリーニングすることによって、抗体産生能、増殖能とも安定し、LARの細胞内ドメインに特異性を有するクローンYU1が得られた。

このハイブリドーマ細胞YU1は、1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、その受託番号は、FERM BP-6343である。

e. モノクローナル抗体のタイピング

上記dで得られたハイブリドーマ細胞YU1の培養上清0.5 ml を 4.5 ml の TBS-T で希釈し、希釈液のうち 3 mlについてMouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham International plc. 製) を用いて、アイソタイプを調べた。その結果、抗体のアイソタイプは、IgG2b κ であった。

f. モノクローナル抗体の調製と精製

6 週齢の雌性 Balb/c マウスに対し、0.5 ml / 匹のプリスタンを経口投与し、その10 日後に、上記dのクローニングで得られたハイブリドーマ細胞YU1を、1 匹あたり $2.5 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^7$ 細胞数/0.5 ml / 匹で腹腔内へ注入した。10日後ごろから、マウスの腹部肥大を認めたため

20ゲージの注射針を用いて数回にわたり腹水を採取した。採取した腹水は、1,000 rpm、4 °Cにて5 分間遠心分離し、上清と沈殿物とに分けた。上清は、37 °Cで30 分間処理した後、4 °Cに一晩静置した。12,000 rpm、4°Cにて10 分間遠心分離し、得られた上清 1.5 ml よりアフィニティーカラムHiTrap ProteinG (Pharmacia Biotech社製) を用いてモノクローナル抗体YU1を精製した。得られた抗体溶液の280 nm における吸光度を測定し、マウスIgG の分子吸光係数より抗体濃度を算出した。

さらに、このモノクローナル抗体YU1につき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の移動度から見かけの分子量を明らかにした。この結果を第6図に示す。第6図に明らかなように、モノクローナル抗体YU1は、約50 kDのH鎖と、約25 kDのL鎖を含み、約150 kDの分子量を有していた。

[実施例2] モノクローナル抗体の特異性の検討

実験例1、aおよびbに記載した手順に従って、LAR WTの発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションした。その細胞溶解液について、実施例1で得られた精製モノクローナル抗体を用いて免疫沈降後、イムノブロッティングを行った。免疫沈降での対照として、IgG1サブクラスに属する抗体（抗LAR E-サブユニット抗体（前記）および抗CD45抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、35-Z6））に対してはMOPC 21を、モノクローナル抗体YU1に対しては マウスIgG2b κ （MOPC 195、CAPPEL社製）を用いた。

係るCOS-7細胞へのLAR強制発現系を用いた解析により、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、モノクローナル抗体YU1は、LAR P-サブユニットに相当する 85 kDaとプレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質を認識した（第7図B参照）。

さらに、LARをトランスフェクションした COS-7細胞の細胞抽出液をこれらの抗体 (IgG1、IgG2b、またはYU1) により免疫沈降後、LAR E-サブユニットを認識する抗体でイムノブロッティングを行ったところ、抗体 YU1で免疫沈降したもののみで、LAR E-サブユニットに相当する150 kDaと、プレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質が検出された (第7図 A)。以上の結果より、モノクローナル抗体YU1は、LARのP-サブユニットの免疫沈降およびイムノブロッティングに利用可能であることが明らかとなった。

1 0 [実施例3] インスリンレセプターチロシンキナーゼによる LARのリン酸化

実験例4によって、インスリンレセプターとLARのコトランスフェクションにより検出されるチロシンリン酸化された 85 kDaのバンドが LARのP-サブユニットである可能性が考えられた。

1 5 そこで実施例1にて作製したモノクローナル抗体YU1を用いて、インスリンレセプターチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化された85 kDaの蛋白質が LAR P-サブユニットであるかの検討を、実験例1に記載したと同様の手技に基づいて行った。

LAR WTまたはLAR C/Sと IRをコトランスフェクション後、インスリンで1分間刺激したCOS-7細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降した後、抗 LAR E-サブユニット抗体と抗体YU1との混合物でイムノブロッティングすると、LARのプレカーサーと各サブユニットが検出された。

2 0 このブロットをさらに抗リン酸化チロシン抗体でリプローブしたところ、85 kDaのチロシンリン酸化バンドが LAR P-サブユニットのバンドと一致した (第8図参照)。これらの結果は、LARがインスリンレセプター

の基質の一つであることを示すものである。

さらに、この LAR P-サブユニットのチロシンリン酸化は LAR WTとの
コトランスフェクタントで検出されなかったことから、LARは自己脱リン
酸化すると考えられた（第3図参照）。

- 5 第9図に示すように、インスリンがインスリンレセプター α 鎖に結合
すると、インスリンレセプターの β 鎖が自己リン酸化されチロシンキナ
ーゼ活性が上昇する。このチロシンキナーゼの働きにより、最終的にグ
ルコースの取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリン作用が発現
する。この活性化されたインスリンレセプターは、LARによってチロシン
10 脱リン酸化を受けて不活性化状態に戻ることが示された。

- また、インスリンレセプターチロシンキナーゼは LARの細胞内ドメイ
ンをチロシンリン酸化することが明らかとなり、このリン酸化が LARの
基質特異性の決定か、ホスファターゼ活性の上昇に関与していることが
推測された。そしてLARは、このリン酸化チロシンを自己脱リン酸化する
15 ことによりその酵素活性を制御していると考えられる。

以上の結果より、LARの酵素活性の促進がインスリン抵抗性の原因とな
る可能性を分子レベルで示すことができた。

〔実施例4〕マウスでのLARの組織分布

- 20 7週齢雄性C57BL/6マウスから摘出した各臓器1gに対し、冷細胞溶解用
バッファー（実験例1、c欄に記載したものに同じ）3 mlを加え、氷
上でホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4℃、
15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上
清をそれぞれの組織試料として用いた。タンパク定量はDC Protein Ass
25 ay（バイオラッド）のマニュアルに従って行った。
得られた各上清（タンパク質0.2 mgに相当）を電気泳動後、YU1を用

い、実験例1、e欄に記載した方法に従って、イムノブロットを行った。

得られた結果を図14に示す。YU1はマウスのLARも認識することができ、胸腺および脳でのLARの発現を確認することができた。腎臓および肝

5 臓でも若干の発現が認められた。

Section
[実施例5] YU1による甲状腺癌組織切片の免疫染色

甲状腺の組織を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後パラフィン

10 示す。
block *specimen*

1. 脱パラフィン操作

固定したパラフィンブロックを100%キシレンに5分間×2回浸し、その後100%エタノール、90%エタノール、70%エタノールにそれぞれ3分間浸した。最後に10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に浸した。この状態で

15 抗原決定基を露出させるために、100℃、5分間オートクレーブにかけた。

2. 免疫染色

0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6) (トリス液) で洗淨し、さらにこのトリス液に浸した。その後、内因性ペルオキシダー

20 ぜの除去を目的に、液をスライドガラスから拭い取り3%過酸化水素水を組織の上に滴下し、3分間放置した。

ブロッキングは、水で十分に洗淨後、さらにトリス液で十分に洗淨し余分な液を拭い取った後、キャリアタンパク(2%BSA)と0.015Mアジ化ナトリウムおよび0.15M NaClを含んだ50mM Tris-HCl緩衝液

25 (pH7.6) 液で組織を覆い15分間放置することにより行った。

次いで、洗淨しないで余分な液を拭い取り、一次抗体YU1

(原液を1000倍希釈)を滴下後、そのまま湿潤箱の中で90分間放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄した後、二次抗体 (ビオチン化抗マウスイムノグロブリン) を滴下し
5 45分放置した。

その後、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄し、ストレプトアビジン接合セイヨウワサビペルオキシダーゼを滴下後、25分放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄後、0.02% 過酸化水素および0.15M NaCl を含む0.05%DAB (3,3'-ジミ
10 ノベンチジン四塩酸)の50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) を滴下し、顕微鏡下で発色を確認し、水の中にスライドガラスを浸すことによって反応を停止させた。

反応停止後、マイヤーのヘマトキシリンに5-10秒間浸し、後染色を行った。その後、水洗し、100%エタノールに1分間×2回、100%キシレンに1分間×2回浸した後、マリノールで封入し、観察した。
15

尚、ブロッキング、二次抗体、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ溶液はDAKO Japan Co. Ltd., (Kyoto)のLSAB キットを用い、DABはDojindo (Kumamoto)の試薬を、MalinolはMuto Pure Chemicals Ltd.,
20 (Tokyo)を、マイヤーのヘマトキシリンは自作のものを使用した。

こうして得られた甲状腺癌細胞の免疫染色の結果を図11～13に示す。これらの図から、癌化した甲状腺組織細胞にYU1抗体が選択的に結合し (褐色染色部)、正常の濾胞細胞および腫瘍組織の間質には結合しない (青色染色部) ことが判る。

25 従って、この抗体を用いて甲状腺癌の組織切片染色による診断が可能であること、さらにはこの抗体が抗癌剤 (化学療法剤) を含むDDSシステ

ムにおいて有用であることも明らかになった。

〔実施例 6〕 他の良性腫瘍細胞および癌細胞組織の免疫染色

実施例 5 に記載したと同様の手順により、以下の表 1 に示す種々の良
5 性腫瘍細胞および癌化細胞組織（ヒト由来）の免疫染色を実施した。

YU1抗体との結合性に基づく染色が認められたものを陽性として、その
割合を以下の表 1 に示す。

表 1

腫瘍		症例	陽性例数	陽性率
良 性	髄膜腫	10	0	0
	グリオーマ	13	1	7.7
	甲状腺腺腫	10	0	0
悪 性	甲状腺癌	21	21	100
	胃癌	16	1	6.3
	大腸癌	26	13	50
	肺癌	20	2	10
	乳癌	20	3	15
	肝癌	8	0	0
	腎癌	21	0	0
	前立腺癌	32	2	6.3

この結果、甲状腺癌での陽性率は100%であり、良性腫瘍やその他の臓器の癌では陽性率が低いか、または完全に陰性であることが明らかになった。大腸癌で比較的高い陽性率が示されているがここで認められた陽性染色像は、甲状腺癌におけるものと随分異なっており、顕著な染色が認められた甲状腺癌細胞に対するYU1の特異的免疫反応性が示唆された。

[実施例 7] YU1による甲状腺癌の特異的免疫反応：イムノアッセイ利用可能性の検討

10 実施例 5 で使用したヒト甲状腺癌組織および正常組織各1gに対し、冷細胞溶解用バッファー（同上） 3ml を加え、氷上でポリトロンを用いてホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4℃、15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上清を用いた。タンパク定量はDC Protein Assay（バイオラッド）のマニュアルに従って行った。

15 得られた上清（タンパク質1 mgに相当）、あるいは 陽性対照として、COS-7細胞にヒトLARをトランスフェクトし、抗LAR抗体を用いて免疫沈降したもの（実験例 1 a～c に記載の手順に従って、調製）を電気泳動後、実験例 1、e 欄に記載した方法に従ってYU1を用いてイムノブロットを行った。検出にはImmunoStar Reagents（和光純薬工業）を用いた。

20

こうして得られた結果を図 1 4 に示す。図 1 4 に示されるとおり、YU1は正常の甲状腺細胞と異なり、癌化した甲状腺組織を特異的に認識することが明らかになった。従って、甲状腺の吸引バイオプシーによって得られる組織試料を甲状腺癌の診断に利用できることが判った。

25

[産業上の利用可能性]

- 本発明によって提供される、LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体は、ホスファターゼ活性を有するLARの細胞内ドメインを特異的に認識することができる。従って、この抗体は、インスリンのシグナル伝達機構を解明したり、LARのモジュレーターや結合タンパク質等を同定、
- 5 取得するために極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

- さらに本発明の抗体は、甲状腺癌に対する特異的免疫反応性を有する
- 10 ので、吸引バイオプシーや組織切片を用いた甲状腺癌の診断、甲状腺癌治療のためのDDSを利用した医薬組成物などに有用であり、また、甲状腺癌細胞におけるLAR分子の転写、翻訳レベルでの発現調節因子の分子生物学的研究にも貢献することができる。

請求の範囲

1. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体。
2. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体。
- 5 3. LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有し、且つCD45に対する特異性を有しない抗体。
4. 配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片を抗原として調製される請求の範囲第1乃至3項のいずれかに記載の抗体。
- 1 0 5. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載の抗体。
6. 免疫原としてLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の抗体。
- 1 5 7. 免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の抗体。
8. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求の範囲第7項記載の抗体。
- 2 0 9. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティーによって精製されるもの
- 2 5

であって、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第8項記載の抗体。

10. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第6乃至9項のいずれかに記載の抗体。
11. 受託番号がFERM BP-6343であるハイブリドーマにより産生される、LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有するモノクローナル抗体。
10. 12. 約150 kDaの分子量を有する請求の範囲第5乃至11項のいずれかに記載の抗体。
13. 請求の範囲第5乃至10項または第12項記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。
14. 受託番号がFERM BP-6343であるハイブリドーマ細胞系。
15. 15. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原としてLARホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を用いることを特徴とする方法。
16. LARのホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることを特徴とする方法。
17. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GST遺伝子のコード領域およびLAR遺伝子のホスファターゼドメインのコード領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求

の範囲第 16 項記載の方法。

18. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティーによって精製されるものであって、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第 17 項記載の方法。

19. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第 15 乃至 18 項のいずれかに記載の方法。

20. LARおよび／またはLAR由来分子の定量方法であって、請求の範囲第 1 乃至 12 項のいずれかに記載の抗体を使用して、被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドの量を測定することを特徴とする定量方法。

21. 前記抗体が、イムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される請求の範囲第 20 項記載の定量方法。

22. LARおよび／またはLAR由来分子の活性を定量するための方法であって、請求の範囲第 1 乃至 12 項のいずれかに記載の抗体を用いて被検試料中に含まれるLARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを単離し、単離されたLARの活性を測定する工程を含む方法。

23. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求の範囲第 22 項記載の方法。

24. LARおよび／またはLAR由来分子を生産するための方法であって、請求の範囲第 1 乃至 12 項のいずれかに記載の抗体を用いてLARのタンパ

ク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを単離する工程を含む方法。

25. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求

5 の範囲第24項記載の方法。

26. LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であって、請求の範囲第1乃至12項のいずれかに記載の抗体を用いて免疫組織学的検査を行い、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出

10 する工程を含む方法。

27. 甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体。

28. 甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する請求の範囲第1乃至12項のいずれかに記載の抗体。

29. 甲状腺癌の診断方法であって、

15 甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料を採取し、請求の範囲第27または28項に記載の抗体と該組織試料との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする方法。

30. 前記甲状腺組織試料が穿刺吸引細胞診により採取される試料であ

20 り、イムノアッセイによって免疫反応性が評価される請求の範囲第29項記載の方法。

31. 前記甲状腺組織試料が甲状腺組織切片であり、組織染色によって免疫反応性が評価される請求の範囲第29項記載の方法。

32. 甲状腺癌の組織診断用組成物であって、請求の範囲第27または

25 28項記載の抗体を含むことを特徴とする組成物。

33. 請求の範囲第27または28項記載の抗体を用いて甲状腺癌細胞

に対して標的化されたことを特徴とするDDS製剤。

34. 前記DDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される1以上の物質を含む請求の範囲第33記載のDDS製剤。

5 35. 前記DDS製剤が、甲状腺癌の診断用医薬組成物である請求の範囲第33または34記載のDDS製剤。

36. 前記DDS製剤が、甲状腺癌の治療用医薬組成物である請求の範囲第33または34記載のDDS製剤。

37. さらに抗癌剤を含む請求の範囲第36項記載のDDS製剤。

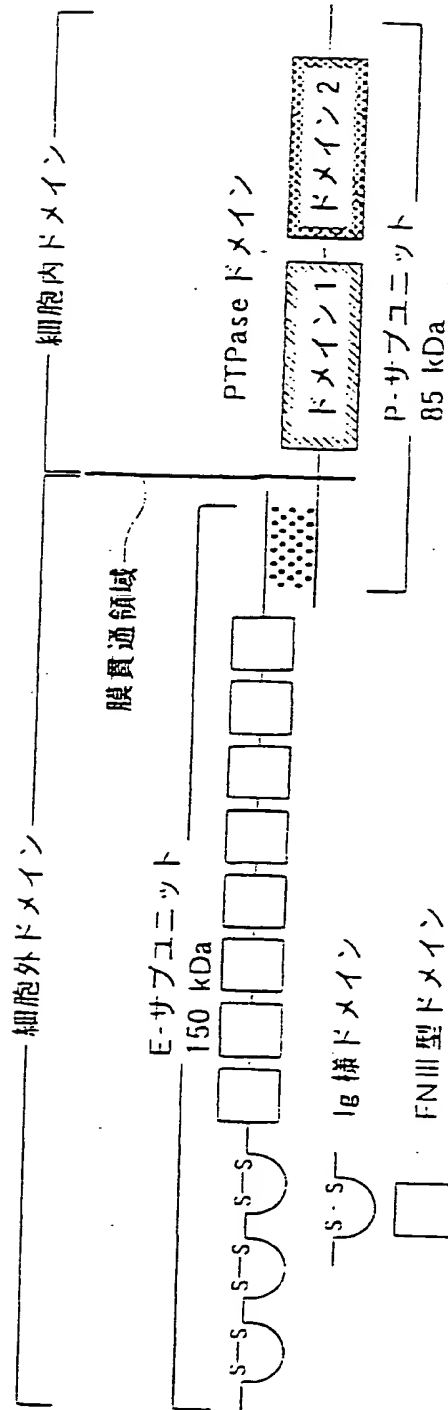
10 38. 前記核酸がアンチセンス核酸またはリボザイムである請求の範囲第36または37項記載のDDS製剤。

39. LARのmRNAに対するプローブを用いることによる甲状腺癌の診断方法。

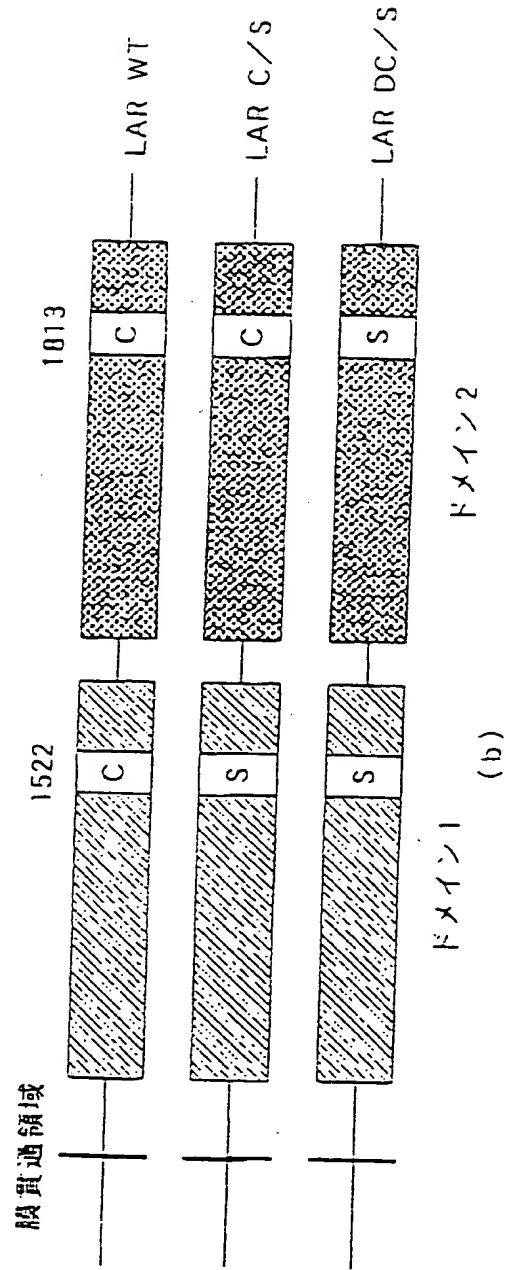
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1

1/14



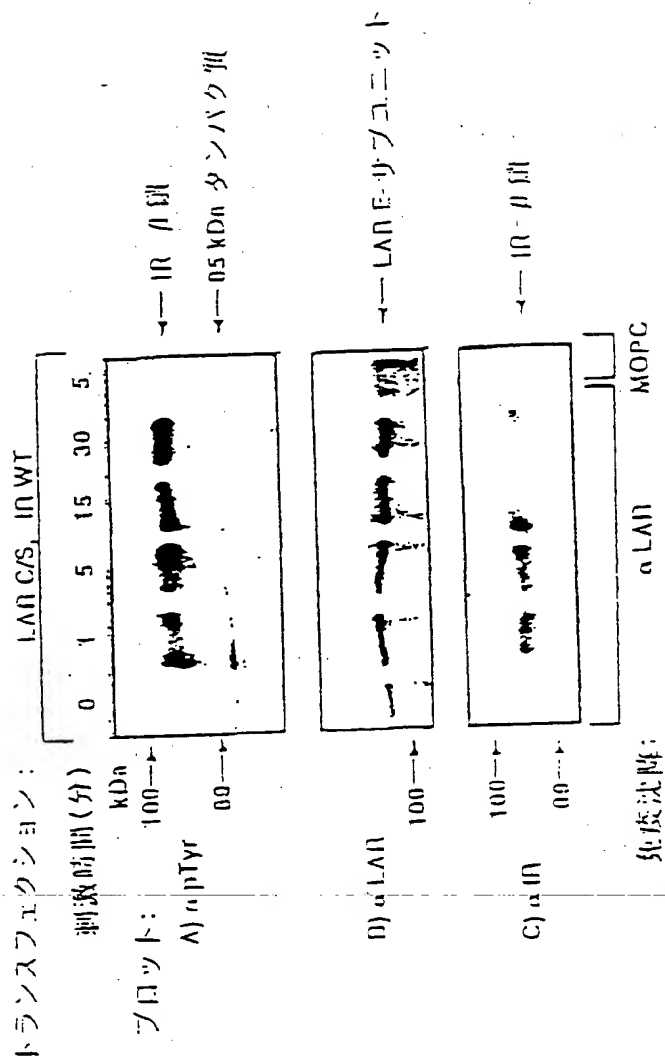
(a)



(b)

第2図

2/14



第3図

3/
14

トランスフェクション:

プロット:

A) α pTyrB) α IRC) α LAR

免疫沈降:

D) α IR

IR WT

LAR
WTLAR
C/SLAR
DC/S \leftarrow IR β 鎖
 \leftarrow 65 kDa タンパク質 \leftarrow IR β 鎖 \leftarrow LAR E-サブユニット α LAR \leftarrow IR β 鎖

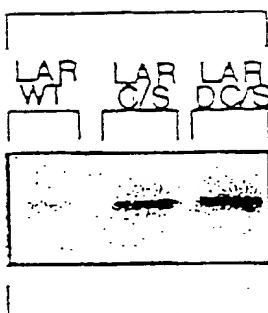
総溶解液

第4図

4 / 14

トランスフェクション:

IR WT

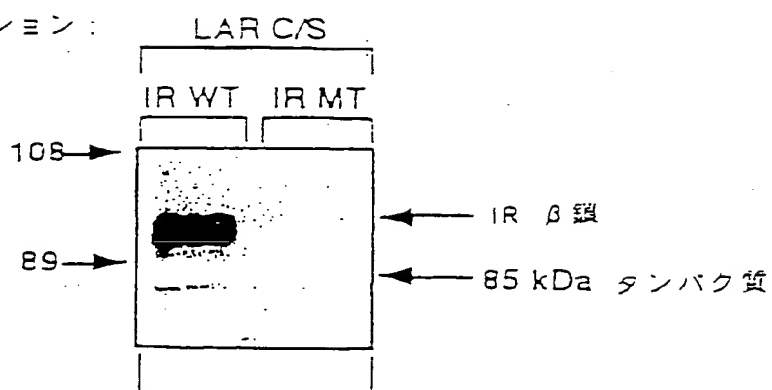
プロット: α pTyr← IR β 鎖

総溶解液

第5図

5 / 14

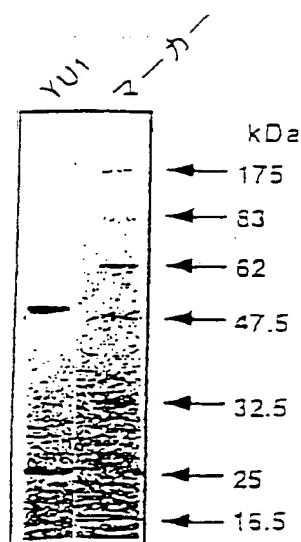
トランスフェクション:



免疫沈降: α LAR
プロット: α pTyr

第6図

6 / 14



第7図

7/14

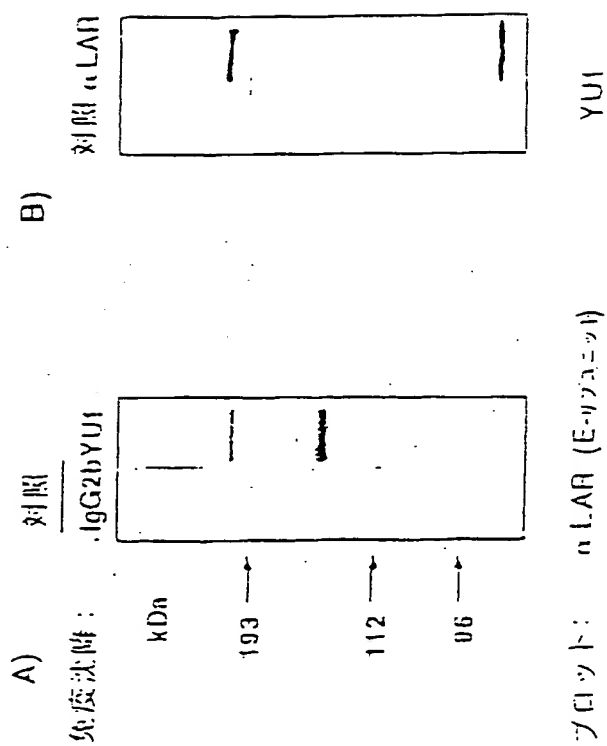
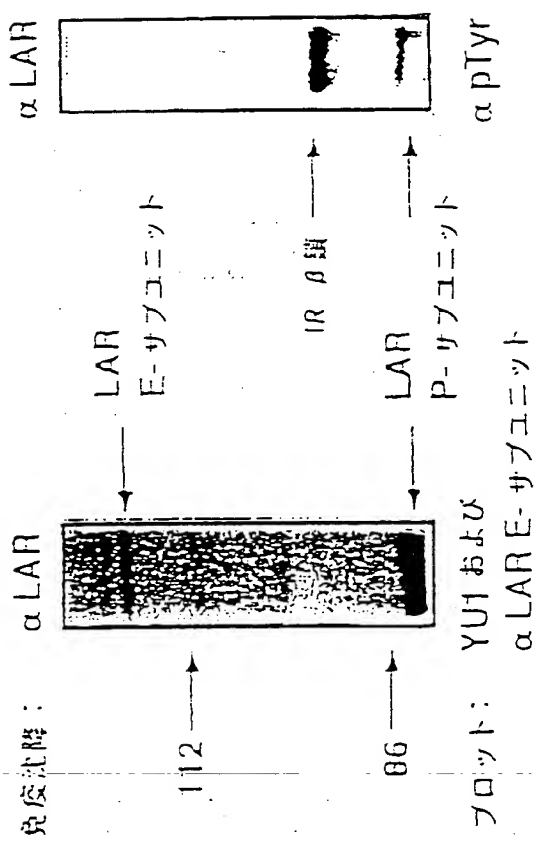
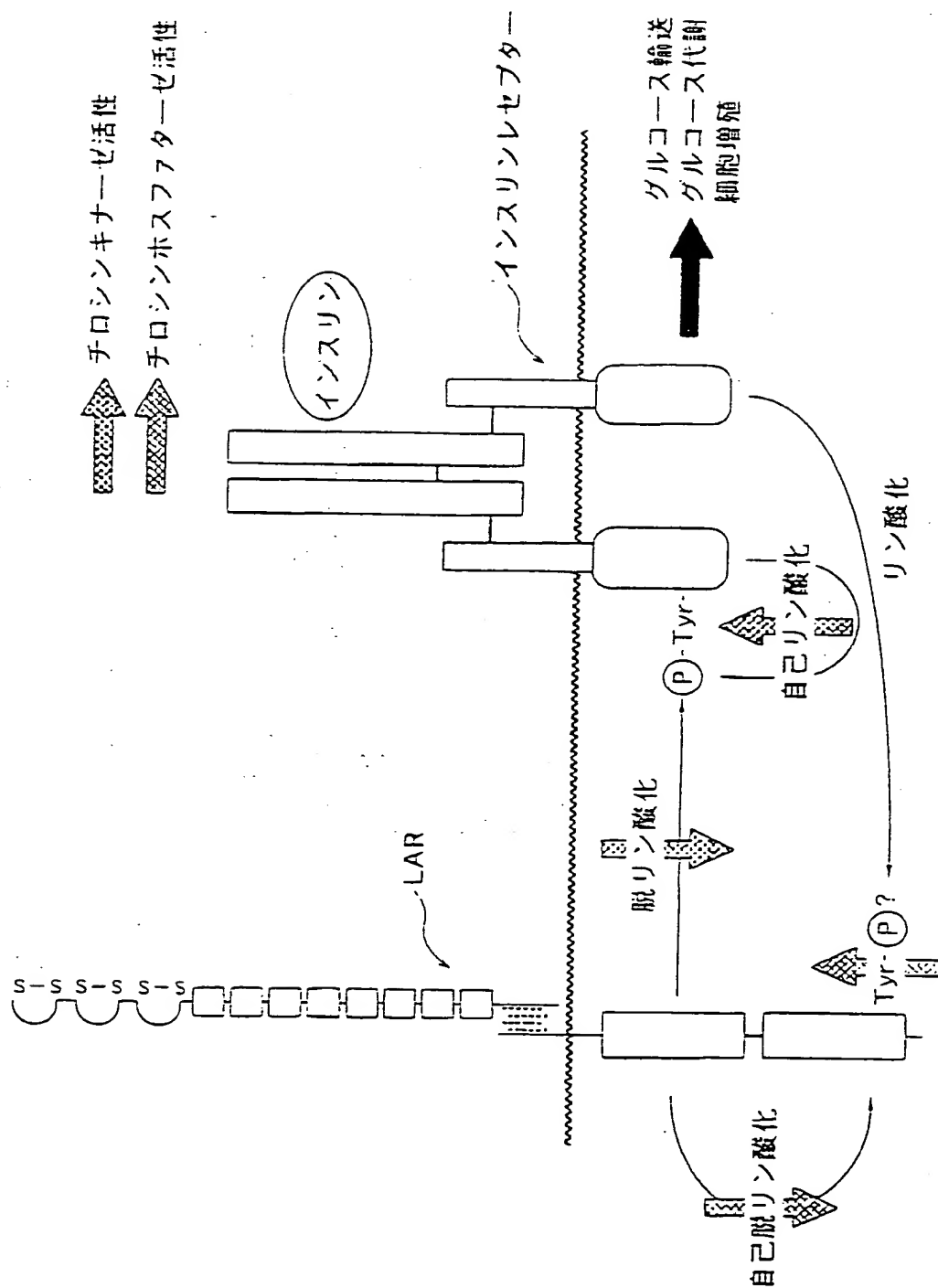


図8

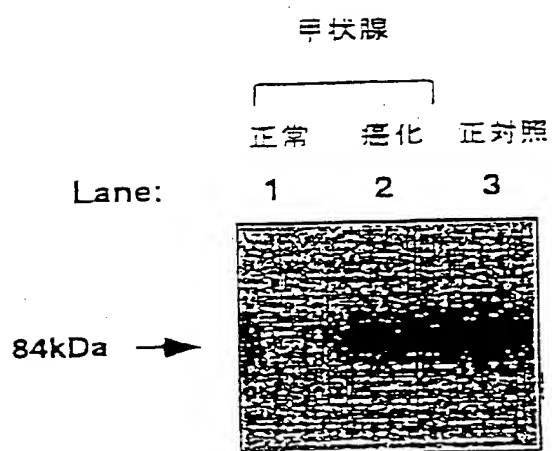
8/14





第10図

10/14



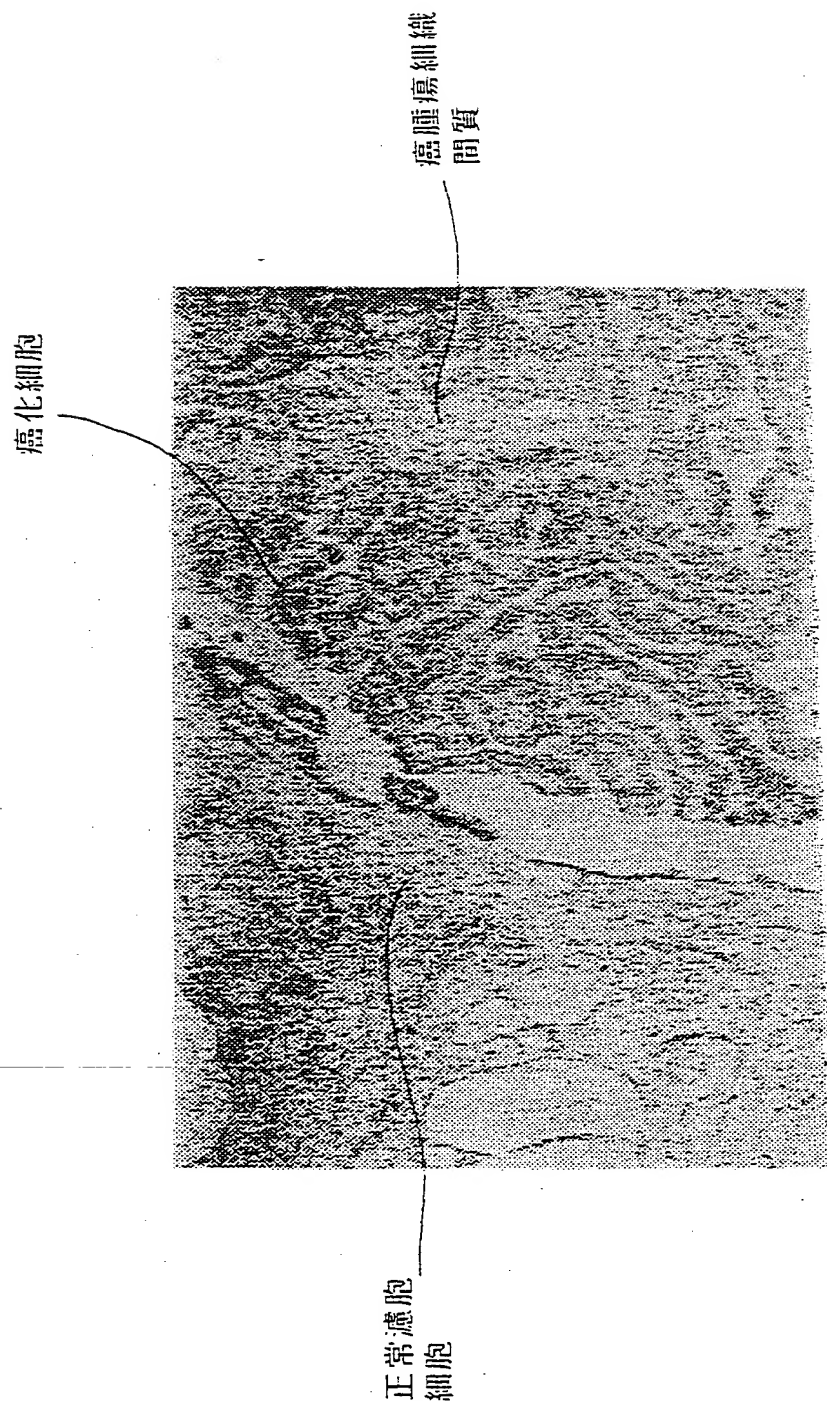
第11図

11
14



第12図

12
/ 14



第13図

13 / 14



第14図

14 / 14



SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Antibody Specific for Phosphatase Subunit of LAR

<130> 99P133W0

<160> 3

<210> 1

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (6).. (1826)

<220>

<221> misc_feature

<222> (213).. (953)

<223> Phosphatase Domain 1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1080).. (1826)

<223> Phosphatase Domain 2

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No.Y00815

<309> 1995-09-19

<400> 1

gatcc gga ctg aag gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag 50

Gly Leu Lys Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu

1 5 10 15

atg cgg agg ctc aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc 98

Met Arg Arg Leu Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro

20 25 30

atc ccc atc acc gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac 146

Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn

35 40 45

gat ggc ctc aag ttc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct gga cag 194

Asp Gly Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln

50 55 60

cag ttc acg tgg gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac 242

Gln Phe Thr Trp Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn

65 70 75

cgc tat gcg aat gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc 290

Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr

80 85 90 95

tct atc gat ggc gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc	338
Ser Ile Asp Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile	
100 105 110	
gat ggc tac cgc aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg	386
Asp Gly Tyr Arg Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu	
115 120 125	
ccc gag acc atg ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg	434
Pro Glu Thr Met Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr	
130 135 140	
gcc act gtg gtc atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa	482
Ala Thr Val Val Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys	
145 150 155	
tgt gat cag tac tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att	530
Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile	
160 165 170 175	
cag gtg acc ctg ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc	578
Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg	
180 185 190	
acc ttc gca ctc cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt	626
Thr Phe Ala Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg	
195 200 205	
cag ttt cag ttc atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca	674
Gln Phe Gln Phe Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro	
210 215 220	

act ccc atc ctg gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta 722
Thr Pro Ile Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu
225 230 235
gac gca ggg ccc atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc 770
Asp Ala Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr
240 245 250 255
ggc tgc ttc atc gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag 818
Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu
260 265 270
aag acg gtg gac atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg 866
Lys Thr Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg
275 280 285
aac tac atg gtg cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg 914
Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala
290 295 300
ctg ctg gag gct gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac 962
Leu Leu Glu Ala Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn
305 310 315
ctg tat gcc cac atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt 1010
Leu Tyr Ala His Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser
320 325 330 335
gtg acc gcc atg gag ctc gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc 1058
Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala
340 345 350

cac acg tcc cgc ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag 1106
His Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys
355 360 365

aac cgg ctg gtg aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg 1154
Asn Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu
370 375 380

cag ccc atc cgt ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc 1202
Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe
385 390 395

ctg gat ggt tat aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct 1250
Leu Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro
400 405 410 415

ctg gca gag agc acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat 1298
Leu Ala Glu Ser Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn
420 425 430

tcc acc atc atc gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag 1346
Ser Thr Ile Ile Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu
435 440 445

aaa tgc cac cag tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac 1394
Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr
450 455 460

ttt gtt gtt gac ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg 1442
Phe Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu
465 470 475

cgt gag ttc aag gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc 1490
 Arg Glu Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile
 480 485 490 495
 cgg cag ttc cag ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca 1538
 Arg Gln Phe Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr
 500 505 510
 ggc gag gga ttc att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag 1586
 Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu
 515 520 525
 cag ttt gga cag gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg 1634
 Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val
 530 535 540
 ggc cgc acc ggg gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg 1682
 Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met
 545 550 555
 cgc tat gag ggc gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt 1730
 Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg
 560 565 570 575
 aca cag cgt cct gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc 1778
 Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys
 580 585 590
 tac cgt gcg gcc ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg 1826
 Tyr Arg Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr
 595 600 605
 taactaccgc tccctctccc tccgccaccc ccgcctggg gctccggagg ggacccagct 1886
 cctctgagcc ataccgacca tcgtccagcc ctctacgca gatgctgtca ctggcagagc 1946

acagcccacg gggatcacag cgtttcagga acgttgccac accaatcaga gagcctagaa 2006
catccctggg caagtggatg gccagcagg caggcactgt ggcccttctg tccaccagac 2066
ccacctggag cccgcttcaa gctctctgtt gcgctcccgc atttctcatg cttcttctca 2126
tgggggtgggg ttggggcaaa gcctcccttt taatacatta agtggggtag actgagggat 2186
tttagcctct tccctctgat ttttcccttc gcgaatccgt atctgcagaa tgggccactg 2246
taggggttgg ggtttatttt gttttgtttt ttttttttt ttgtatgact tctgtgaag 2306
gacagaacat tgccttcctc gtgcagagct ggggctgcc gcctgagcgg aggctcggcc 2366
gtgggcccgg aggcagtgt gatccggctg ctctccagc cttcagacg agatcctgtt 2426
tcagctaaat gcagggaac tcaatgtttt ttaagtgtt gtttccctt taaagcctt 2486
tttaggccca cattgacagt ggtgggcccgg gagaagatag ggaacactca tccctggctg 2546
tctatcccag tgtgtgttta acattcacag ccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc 2606
tggcaaggca ttctcatca ccacgtgtt tgcaaagggt aaaaacaaaa caaaaaacca 2666
caaaaataaa aaacaaaaaa aacaaaaaac caaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct 2726
tggcttctgc ttcaaaccct caagagggga agcaactcg tgtgcctggg gttcccgagg 2786
gagctgctgg ctgacctggg ccacagagc ctggctttgg tcccagcat tgcagtatgg 2846
tgtggtgtt gtaggctgt gggctctggct gtgtggccaa ggtgaatagc acaggtagg 2906
gtgtgtgcca caccctatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc cttcaggtc 2966
caggccagtg ggcctggtag cacatgtctg tctcagagc aggggccaga tgattttcct 3026
ccctggtttg cagctgtttt caaagcccc gataatcgt ctttccact ccaagatgcc 3086
ctcataaacc aatgtggcaa gactactgga ctctatcaa tggtagtcta atcagtcctt 3146
attatcccag cttgtgagg ggcagggaga gcgcctcttc ctctgggcag cgctatctag 3206
ataggttaagt gggggcgggg aagggtgcat agctgtttta gctgagggac gtggtgccga 3266
cgtcccaaaa cctagctagg ctaagtcaag atcaacattc cagggttggg aatgttggat 3326
gatgaaacat tcatttttac cttgtggatg ctagtgtgt agagtacact gttgtacaca 3386
gtctgttttc tatttgttaa gaaaaactac agcatcattg cataattctt gatggtaata 3446
aattgaata atcagatttc t 3467

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Signature Motif Conserved in Phosphatase Domain of Known
PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (1)

<223> "Xaa"="Ile" or "Val".

<220>

<221> UNSURE

<222> (10)

<223> "Xaa"="Ser" or "Thr".

<400> 2

Xaa His Cys Xaa Ala Gly Xaa Xaa Arg Xaa Gly

1

5

10

<210> 3

<211> 7702

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (371).. (6064)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (371).. (418)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (419).. (6061)

<220>

<221> misc_feature

<222> (419).. (4120)

<223> Extracellular Domain

<220>

<221> misc_feature

<222> (4121).. (4192)

<223> Transmembrane Domain

<220>

<221> misc_feature

<222> (4193).. (6061)

<223> Cytoplasmic Domain

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. Y00815

<309> 1995-09-19

<400> 3

cgggagcggc gggagcggg gcggcggcag aggcggcggc tccagcttcg gctccggctc 60
gggctcgggc tccggctccg gctccggctc cggctccagc tcgggtggcg gtggcgggag 120
cgggaccagg tggaggcggc ggccggcagag gaggggagc agcggcccta gcggcttgcg 180
gggggacatg cggaccgacg gcccttgat aggcggaagg agtggaggcc ctgggtgccg 240
gcccttggtg ctgagtatcc agcaagagtg accgggggtga agaagcaaag actcggttga 300
ttgtcctggg ctgtggctgg ctgtggagct agagcccttg atggccctg agccagcccc 360
agggaggacg atg gtg ccc ctt gtg cct gca ctg gtg atg ctt ggt ttg 409

Met Val Pro Leu Val Pro Ala Leu Val Met Leu Gly Leu

-15

-10

-5

gtg gca ggc gcc cat ggt gac agc aaa cct gtc ttc att aaa gtc cct 457
Val Ala Gly Ala His Gly Asp Ser Lys Pro Val Phe Ile Lys Val Pro

1

5

10

gag gac cag act ggg ctg tca gga ggg gta gcc tcc ttc gtg tgc caa 505
Glu Asp Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Gln

15

20

25

gct aca gga gaa ccc aag ccg cgc atc aca tgg atg aag aag ggg aag 553
Ala Thr Gly Glu Pro Lys Pro Arg Ile Thr Trp Met Lys Lys Gly Lys

30

35

40

45

aaa gtc agc tcc cag cgc ttc gag gtc att gag ttt gat gat ggg gca 601
Lys Val Ser Ser Gln Arg Phe Glu Val Ile Glu Phe Asp Asp Gly Ala
50 55 60

ggg tca gtg ctt cgg atc cag cca ttg cgg gtg cag cga gat gaa gcc 649
Gly Ser Val Leu Arg Ile Gln Pro Leu Arg Val Gln Arg Asp Glu Ala
65 70 75

atc tat gag tgt aca gct act aac agc ctg ggt gag atc aac act agt 697
Ile Tyr Glu Cys Thr Ala Thr Asn Ser Leu Gly Glu Ile Asn Thr Ser
80 85 90

gcc aag ctc tca gtg ctc gaa gag gaa cag ctg ccc cct ggg ttc cct 745
Ala Lys Leu Ser Val Leu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Pro Gly Phe Pro
95 100 105

tcc atc gac atg ggg cct cag ctg aag gtg gtg gag aag gca cgc aca 793
Ser Ile Asp Met Gly Pro Gln Leu Lys Val Val Glu Lys Ala Arg Thr
110 115 120 125

gcc acc atg cta tgt gcc gca ggc gga aat cca gac cct gag att tct 841
Ala Thr Met Leu Cys Ala Ala Gly Gly Asn Pro Asp Pro Glu Ile Ser
130 135 140

tgg ttc aag gac ttc ctt cct gta gac cct gcc acg agc aac ggc cgc 889
Trp Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp Pro Ala Thr Ser Asn Gly Arg
145 150 155

atc aag cag ctg cgt tca ggt gcc ttg cag ata gag agc agt gag gaa 937
Phe Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu
160 165 170

tcc gac caa ggc aag tac gag tgt gtg gcg acc aac tcg gca ggc aca 985
Ser Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly Thr
175 180 185
cgt tac tca gcc cct gcg aac ctg tat gtg cga gtg cgc cgc gtg gct 1033
Arg Tyr Ser Ala Pro Ala Asn Leu Tyr Val Arg Val Arg Arg Val Ala
190 195 200 205
cct cgt ttc tcc atc cct ccc agc agc cag gag gtg atg cca ggc ggc 1081
Pro Arg Phe Ser Ile Pro Pro Ser Ser Gln Glu Val Met Pro Gly Gly
210 215 220
agc gtg aac ctg aca tgc gtg gca gtg ggt gca ccc atg ccc tac gtg 1129
Ser Val Asn Leu Thr Cys Val Ala Val Gly Ala Pro Met Pro Tyr Val
225 230 235
aag tgg atg atg ggg gcc gag gag ctc acc aag gag gat gag atg cca 1177
Lys Trp Met Met Gly Ala Glu Glu Leu Thr Lys Glu Asp Glu Met Pro
240 245 250
gtt ggc cgc aac gtc ctg gag ctc agc aat gtc gta cgc tct gcc aac 1225
Val Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Ser Asn Val Val Arg Ser Ala Asn
255 260 265
tac acc tgt gtg gcc atc tcc tcg ctg ggc atg atc gag gcc aca gcc 1273
Tyr Thr Cys Val Ala Ile Ser Ser Leu Gly Met Ile Glu Ala Thr Ala
270 275 280 285
cag gtc aca gtg aaa gct ctt cca aag cct ccg att gat ctt gtg gtg 1321
Gln Val Thr Val Lys Ala Leu Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val
290 295 300

aca gag aca act gcc acc agt gtc acc ctc acc tgg gac tct ggg aac 1369
Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn
305 310 315

tcg gag cct gta acc tac tat ggc atc cag tac cgc gca gcg ggc acg 1417
Ser Glu Pro Val Thr Tyr Tyr Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr
320 325 330

gag ggc ccc ttt cag gag gtg gat ggt gtg gcc acc acc cgc tac agc 1465
Glu Gly Pro Phe Gln Glu Val Asp Gly Val Ala Thr Thr Arg Tyr Ser
335 340 345

att ggc ggc ctc agc cct ttc tcg gaa tat gcc ttc cgc gtg ctg gcg 1513
Ile Gly Gly Leu Ser Pro Phe Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala
350 355 360 365

gtg aac agc atc ggg cga ggg ccg ccc agc gag gca gtg cgg gca cgc 1561
Val Asn Ser Ile Gly Arg Gly Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg
370 375 380

acg gga gaa cag gcg ccc tcc agc cca ccg cgc cgc gtg cag gca cgc 1609
Thr Gly Glu Gln Ala Pro Ser Ser Pro Pro Arg Arg Val Gln Ala Arg
385 390 395

atg ctg agc gcc agc acc atg ctg gtg cag tgg gag cct ccc gag gag 1657
Met Leu Ser Ala Ser Thr Met Leu Val Gln Trp Glu Pro Pro Glu Glu
400 405 410

ccc aac ggc ctg gtg cgg gga tac cgc gtc tac tat act ccg gac tcc 1705
Pro Asn Gly Leu Val Arg Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr Thr Pro Asp Ser
415 420 425

cgc cgc ccc ccg aac gcc tgg cac aag cac aac acc gac gcg ggg ctc 1753
Arg Arg Pro Pro Asn Ala Trp His Lys His Asn Thr Asp Ala Gly Leu
430 435 440 445
ctc acg acc gtg ggc agc ctg ctg cct ggc atc acc tac agc ctg cgc 1801
Leu Thr Thr Val Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Tyr Ser Leu Arg
450 455 460
gtg ctt gcc ttc acc gcc gtg ggc gat ggc cct ccc agc ccc acc atc 1849
Val Leu Ala Phe Thr Ala Val Gly Asp Gly Pro Pro Ser Pro Thr Ile
465 470 475
cag gtc aag acg cag cag gga gtg cct gcc cag ccc gcg gac ttc cag 1897
Gln Val Lys Thr Gln Gln Gly Val Pro Ala Gln Pro Ala Asp Phe Gln
480 485 490
gcc gag gtg gag tcg gac acc agg atc cag ctc tcg tgg ctg ctg ccc 1945
Ala Glu Val Glu Ser Asp Thr Arg Ile Gln Leu Ser Trp Leu Leu Pro
495 500 505
cct cag gag cgg atc atc atg tat gaa ctg gtg tac tgg gcg gca gag 1993
Pro Gln Glu Arg Ile Ile Met Tyr Glu Leu Val Tyr Trp Ala Ala Glu
510 515 520 525
gac gaa gac caa cag cac aag gtc acc ttc gac cca acc tcc tcc tac 2041
Asp Glu Asp Gln Gln His Lys Val Thr Phe Asp Pro Thr Ser Ser Tyr
530 535 540
aca cta gag gac ctg aag cct gac aca ctc tac cgc ttc cag ctg gct 2089
Thr Leu Glu Asp Leu Lys Pro Asp Thr Leu Tyr Arg Phe Gln Leu Ala
545 550 555

gca cgc tcg gat atg ggg gtg ggc gtc ttc acc ccc acc att gag gcc 2137
Ala Arg Ser Asp Met Gly Val Gly Val Phe Thr Pro Thr Ile Glu Ala
560 565 570

cgc aca gcc cag tcc acc ccc tcc gcc cct ccc cag aag gtg atg tgt 2185
Arg Thr Ala Gln Ser Thr Pro Ser Ala Pro Pro Gln Lys Val Met Cys
575 580 585

gtg agc atg ggc tcc acc acg gtc cgg gta agt tgg gtc ccg ccg cct 2233
Val Ser Met Gly Ser Thr Thr Val Arg Val Ser Trp Val Pro Pro Pro
590 595 600 605

gcc gac agc cgc aac ggc gtt atc acc cag tac tcc gtg gcc cac gag 2281
Ala Asp Ser Arg Asn Gly Val Ile Thr Gln Tyr Ser Val Ala His Glu
610 615 620

gcg gtg gac ggc gag gac cgc ggg cgg cat gtg gtg gat ggc atc agc 2329
Ala Val Asp Gly Glu Asp Arg Gly Arg His Val Val Asp Gly Ile Ser
625 630 635

cgt gag cac tcc agc tgg gac ctg gtg ggc ctg gag aag tgg acg gag 2377
Arg Glu His Ser Ser Trp Asp Leu Val Gly Leu Glu Lys Trp Thr Glu
640 645 650

tac cgg gtg tgg gtg cgg gca cac aca gac gtg ggc ccc ggc ccc gag 2425
Tyr Arg Val Trp Val Arg Ala His Thr Asp Val Gly Pro Gly Pro Glu
655 660 665

agc agc ccg gtg ctg gtg cgc acc gat gag gac gtg ccc agc ggg cct 2473
Ser Ser Pro Val Leu Val Arg Thr Asp Glu Asp Val Pro Ser Gly Pro
670 675 680 685

ccg cgg aag gtg gag gtg gag cca ctg aac tcc act gct gtg cat gtc 2521

Pro Arg Lys Val Glu Val Glu Pro Leu Asn Ser Thr Ala Val His Val

690

695

700

tac tgg aag ctg cct gtc ccc agc aag cag cat ggc cag atc cgc ggc 2569

Tyr Trp Lys Leu Pro Val Pro Ser Lys Gln His Gly Gln Ile Arg Gly

705

710

715

tac cag gtc acc tac gtg cgg ctg gag aat ggc gag ccc cgt gga ctc 2617

Tyr Gln Val Thr Tyr Val Arg Leu Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Leu

720

725

730

ccc atc atc caa gac gtc atg cta gcc gag gcc cag tgg cgg cca gag 2665

Pro Ile Ile Gln Asp Val Met Leu Ala Glu Ala Gln Trp Arg Pro Glu

735

740

745

gag tcc gag gac tat gaa acc act atc agc ggc ctg acc ccg gag acc 2713

Glu Ser Glu Asp Tyr Glu Thr Thr Ile Ser Gly Leu Thr Pro Glu Thr

750

755

760

765

acc tac tcc gtt act gtt gct gcc tat acc acc aag ggg gat ggt gcc 2761

Thr Tyr Ser Val Thr Val Ala Ala Tyr Thr Thr Lys Gly Asp Gly Ala

770

775

780

cgc agc aag ccc aaa att gtc act aca aca ggt gca gtc cca ggc cgg 2809

Arg Ser Lys Pro Lys Ile Val Thr Thr Thr Gly Ala Val Pro Gly Arg

785

790

795

ccc acc atg atg atc agc acc acg gcc atg aac act gcg ctg ctc cag 2857

Pro Thr Met Met Ile Ser Thr Thr Ala Met Asn Thr Ala Leu Leu Gln

800

805

810

tgg cac cca ccc aag gaa ctg cct ggc gag ctg ctg ggc tac cgg ctg 2905
Trp His Pro Pro Lys Glu Leu Pro Gly Glu Leu Leu Gly Tyr Arg Leu
815 820 825

cag tac tgc cgg gcc gac gag gcg cgg ccc aac acc ata gat ttc ggc 2953
Gln Tyr Cys Arg Ala Asp Glu Ala Arg Pro Asn Thr Ile Asp Phe Gly
830 835 840 845

aag gat gac cag cac ttc aca gtc acc ggc ctg cac aag ggg acc acc 3001
Lys Asp Asp Gln His Phe Thr Val Thr Gly Leu His Lys Gly Thr Thr
850 855 860

tac atc ttc cgg ctt gct gcc aag aac cgg gct ggc ttg ggt gag gag 3049
Tyr Ile Phe Arg Leu Ala Ala Lys Asn Arg Ala Gly Leu Gly Glu Glu
865 870 875

ttc gag aag gag atc agg acc ccc gag gac ctg ccc agc ggc ttc ccc 3097
Phe Glu Lys Glu Ile Arg Thr Pro Glu Asp Leu Pro Ser Gly Phe Pro
880 885 890

caa aac ctg cat gtg aca gga ctg acc acg tct acc aca gaa ctg gcc 3145
Gln Asn Leu His Val Thr Gly Leu Thr Thr Ser Thr Thr Glu Leu Ala
895 900 905

tgg gac ccg cca gtg ctg gcg gag agg aac ggg cgc atc atc agc tac 3193
Trp Asp Pro Pro Val Leu Ala Glu Arg Asn Gly Arg Ile Ile Ser Tyr
910 915 920 925

acc gtg gtg ttc cga gac atc aac agc caa cag gag ctg cag aac atc 3241
Thr Val Val Phe Arg Asp Ile Asn Ser Gln Gln Glu Leu Gln Asn Ile
930 935 940

acg aca gac acc cgc ttt acc ctt act ggc ctc aag cca gac acc act 3289

Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr

945

950

955

tac gac atc aag gtc cgc gca tgg acc agc aaa ggc tct ggc cca ctc 3337

Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp Thr Ser Lys Gly Ser Gly Pro Leu

960

965

970

agc ccc agc atc cag tcc cgg acc atg ccg gtg gag caa gtg ttt gcc 3385

Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr Met Pro Val Glu Gln Val Phe Ala

975

980

985

aag aac ttc cgg gtg gcg gct gca atg aag acg tct gtg ctg ctc agc 3433

Lys Asn Phe Arg Val Ala Ala Ala Met Lys Thr Ser Val Leu Leu Ser

990

995

1000

1005

tgg gag gtt ccc gac tcc tat aag tca gct gtg ccc ttt aag att ctg 3481

Trp Glu Val Pro Asp Ser Tyr Lys Ser Ala Val Pro Phe Lys Ile Leu

1010

1015

1020

tac aat ggg cag agt gtg gag gtg gac ggg cac tcg atg cgg aag ctg 3529

Tyr Asn Gly Gln Ser Val Glu Val Asp Gly His Ser Met Arg Lys Leu

1025

1030

1035

atc gca gac ctg cag ccc aac aca gag tac tcg ttt gtg ctg atg aac 3577

Ile Ala Asp Leu Gln Pro Asn Thr Glu Tyr Ser Phe Val Leu Met Asn

1040

1045

1050

cgt ggc agc agc gca ggg ggc ctg cag cac ctg gtg tcc atc cgc aca 3625

Arg Gly Ser Ser Ala Gly Gly Leu Gln His Leu Val Ser Ile Arg Thr

1055

1060

1065

gcc ccc gac ctc ctg cct cac aag ccg ctg cct gcc tct gcc tac ata 3673
Ala Pro Asp Leu Leu Pro His Lys Pro Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile
1070 1075 1080 1085
gag gac ggc cgc ttc gat ctc tcc atg ccc cat gtg caa gac ccc tcg 3721
Glu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Ser Met Pro His Val Gln Asp Pro Ser
1090 1095 1100
ctt gtc agg tgg ttc tac att gtt gtg gta ccc att gac cgt gtg ggc 3769
Leu Val Arg Trp Phe Tyr Ile Val Val Val Pro Ile Asp Arg Val Gly
1105 1110 1115
ggg agc atg ctg acg cca agg tgg agc aca ccc gag gaa ctg gag ctg 3817
Gly Ser Met Leu Thr Pro Arg Trp Ser Thr Pro Glu Glu Leu Glu Leu
1120 1125 1130
gac gag ctt cta gaa gcc atc gag caa ggc gga gag gag cag cgg cgg 3865
Asp Glu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Gly Gly Glu Glu Gln Arg Arg
1135 1140 1145
cgg cgg cgg cag gca gaa cgt ctg aag cca tat gtg gct gct caa ctg 3913
Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Leu Lys Pro Tyr Val Ala Ala Gln Leu
1150 1155 1160 1165
gat gtg ctc ccg gag acc ttt acc ttg ggg gac aag aag aac tac cgg 3961
Asp Val Leu Pro Glu Thr Phe Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asn Tyr Arg
1170 1175 1180
ggc ttc tac aac cgg ccc ctg tct ccg gac ttg agc tac cag tgc ttt 4009
Gly Phe Tyr Asn Arg Pro Leu Ser Pro Asp Leu Ser Tyr Gln Cys Phe
1185 1190 1195

gtg ctt gcc tcc ttg aag gaa ccc atg gac cag aag cgc tat gcc tcc 4057
Val Leu Ala Ser Leu Lys Glu Pro Met Asp Gln Lys Arg Tyr Ala Ser
1200 1205 1210
agc ccc tac tcg gat gag atc gtg gtc cag gtg aca cca gcc cag cag 4105
Ser Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Val Val Gln Val Thr Pro Ala Gln Gln
1215 1220 1225
cag gag gag ccg gag atg ctg tgg gtg acg ggt ccc gtg ctg gca gtc 4153
Gln Glu Glu Pro Glu Met Leu Trp Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Val
1230 1235 1240 1245
atc ctc atc atc ctc att gtc atc gcc atc ctc ttg ttc aaa agg aaa 4201
Ile Leu Ile Ile Leu Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Phe Lys Arg Lys
1250 1255 1260
agg acc cac tct ccg tcc tct aag gat gag cag tcg atc gga ctg aag 4249
Arg Thr His Ser Pro Ser Ser Lys Asp Glu Gln Ser Ile Gly Leu Lys
1265 1270 1275
gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag atg cgg agg ctc 4297
Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu Met Arg Arg Leu
1280 1285 1290
aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc atc ccc atc acc 4345
Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro Ile Pro Ile Thr
1295 1300 1305
gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac gat ggc ctc aag 4393
Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys
1310 1315 1320 1325

ttc tcc cag gag tar gag tcc atc gac cct gga cag cag ttc acg tgg 4441
Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln Gln Phe Thr Trp
1330 1335 1340
gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac cgc tat gcg aat 4489
Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn Arg Tyr Ala Asn
1345 1350 1355
gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc tct atc gat ggc 4537
Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr Ser Ile Asp Gly
1360 1365 1370
gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc gat ggc tac cgc 4585
Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr Arg
1375 1380 1385
aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg ccc gag acc atg 4633
Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Met
1390 1395 1400 1405
ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg gcc act gtg gtc 4681
Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Val Val
1410 1415 1420
atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa tgt gat cag tac 4729
Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys Cys Asp Gln Tyr
1425 1430 1435
tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att cag gtg acc ctg 4777
Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile Gln Val Thr Leu
1440 1445 1450

ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc acc ttc gca ctc 4825
Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg Thr Phe Ala Leu
1455 1460 1465
cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt cag ttt cag ttc 4873
His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg Gln Phe Gln Phe
1470 1475 1480 1485
atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca act ccc atc ctg 4921
Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro Ile Leu
1490 1495 1500
gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta gac gca ggg ccc 4969
Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu Asp Ala Gly Pro
1505 1510 1515
atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc ggc tgc ttc atc 5017
Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile
1520 1525 1530
gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag aag acg gtg gac 5065
Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu Lys Thr Val Asp
1535 1540 1545
atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg aac tac atg gtg 5113
~~Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Met Val~~
1550 1555 1560 1565
cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg ctg ctg gag gct 5161
Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala Leu Leu Glu Ala
1570 1575 1580

gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac ctg tat gcc cac 5209
Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn Leu Tyr Ala His
1585 1590 1595
atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt gtg acc gcc atg 5257
Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser Val Thr Ala Met
1600 1605 1610
gag ctc gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc cac acg tcc cgc 5305
Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala His Thr Ser Arg
1615 1620 1625
ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag aac cgg ctg gtg 5353
Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val
1630 1635 1640 1645
aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg cag ccc atc cgt 5401
Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg
1650 1655 1660
ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc ctg gat ggt tat 5449
Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Tyr
1665 1670 1675
aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct ctg gca gag agc 5497
Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Ser
1680 1685 1690
acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat tcc acc atc atc 5545
Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser Thr Ile Ile
1695 1700 1705

gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag aaa tgc cac cag 5593
 Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln
 1710 1715 1720 1725
 tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac ttt gtt gtt gac 5641
 Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val Asp
 1730 1735 1740
 ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg cgt gag ttc aag 5689
 Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Arg Glu Phe Lys
 1745 1750 1755
 gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc cgg cag ttc cag 5737
 Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile Arg Gln Phe Gln
 1760 1765 1770
 ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca ggc gag gga ttc 5785
 Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr Gly Glu Gly Phe
 1775 1780 1785
 att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag cag ttt gga cag 5833
 Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly Gln
 1790 1795 1800 1805
 gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg ggc cgc acc ggg 5881
 Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly
 1810 1815 1820
 gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg cgc tat gag ggc 5929
 Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly
 1825 1830 1835

gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt aca cag cgt cct 5977
Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg Thr Gln Arg Pro
1840 1845 1850
gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc tac cgt gcg gcc 6025
Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys Tyr Arg Ala Ala
1855 1860 1865
ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg taactaccgc 6071
Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr 1881
1870 1875 1880
tccccctctcc tccgccaccc ccgccgtggg gctccggagg ggaccagct cctctgagcc 6131
ataccgacca tcgtccagcc ctctacgca gatgctgtca ctggcagagc acagcccacg 6191
gggatcacag cgtttcagga acgttgccac accaatcaga gagcctagaa catccctggg 6251
caagtggatg gccagcagg caggcacigt ggcccttctg tccaccagac ccacctggag 6311
cccgttcaa gctctctgtt gcgctccgc atttctcatg cttcttctca tgggggtggg 6371
ttggggcaaa gcctcctttt taatacatta agtggggtag actgagggat tttagcctct 6431
tccctctgat ttttctttc gcgaatccgt atctgcagaa tgggccactg taggggttgg 6491
ggtttatttt gttttgtttt tttttttttt ttgtatgact tctgctgaag gacagaacat 6551
tgccttcttc gtgcagagct ggggctgcc aacctgagcg aggctcggcc gtgggccggg 6611
aggcagtgtc gatccggctg ctctccagc ccttcagacg agatcctgtt tcagctaaat 6671
gcagggaac tcaatgtttt ttaagtttt gttttccctt taaagcctt ttttaggcca 6731
cattgacagt ggtgggcggg gagaagatag ggaacactca tccctggctg tctatcccag 6791
tgttgtttta acattcacag ccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc tggcaaggca 6851
ttctcatca ccctcgtgtt tgcaaagggt aaaacaaaa caaaaaacca caaaaaataa 6911
aaacaaaaaa aacaaaaaac ccaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct tggcttctgc 6971
ttcaaaccct caagagggga agcaactccg tgtgcctggg gtcccgagg gagctgctgg 7031
ctgacctggg ccacagagc ctggcttgg tcccagcat tgcagtatgg tgtggtgttt 7091

gtaggctgtg gggctctggct gtgtggccaa ggtgaatagc acaggttagg gtgtgtgcc 7151
caccccatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc ctttcaggtc caggccagt 7211
ggcctggtag cacatgtctg tctcagagc aggggccaga tgattttcct ccctggtttg 7271
cagctgtttt caaagcccc gataatcgt cttttccact ccaagatgcc ctcataaacc 7331
aatgtggcaa gactactgga cttctatcaa tgggtactcta atcagtcctt attatcccag 7391
cttgcctagg ggcagggaga ggcctcttc cctgggcag cgtatctag ataggtaagt 7451
gggggcgggg aagggtgcat agctgtttta gctgaggac gtggtgccga cgtcccaaa 7511
cctagctagg ctaagtcaag atcaacattc cagggttggt aatgttgat gatgaaacat 7571
tcatttttac cttgtggatg ctagtgtgt agagttcact gttgtacaca gtctgttttc 7631
tatttgtaa gaaaaactac agcatcattg cataattctt gatggaata aattgaata 7691
atcagatttc t 7702

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20, C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20, C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takeuchi, T. et al., "Characterization of AE-6 Monoclonal Antibody Recognizing VHCSAGV Sequence in CD45 PTPase Domain" Tissue Antigens (1993) Vol. 42, No. 4 p.441	1-14
Y	Michel, S. et al., "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen" J. Exp. Med. (1988) Vol. 168, No. 5 p.1523-1530	1-28, 32-38
Y	Michel, S. et al., "Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region" EMBO J. (1992) Vol. 11, No. 3 p.897-907	1-28, 32-38
Y	Lawrence, P.F. et al., "Monoclonal Antibodies to the Human $\gamma 2$ Subunit of the GABAA/Benzodiazepine Receptors" J. Neurochem. (1995) Vol. 64, No. 3 p.1305-1311	6-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* "E" earlier document but published on or after the international filing date	* "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "&" document member of the same patent family
* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 August, 1999 (25. 08. 99)

Date of mailing of the international search report
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Faure, P. et al., "Diagnostic Features of Primary Malignant Lymphomas of the Thyroid with Monoclonal Antibodies" Cancer(Phila) (1988) Vol. 61, No. 9 p.1852-1861	27-28, 32-38
Y	Osamu Kanemitsu, "Koutai Kougaku Nyuumon", K.K. Chijin Shokan, (1994) p.145-166	33-38
A	Shvero, J. et al., "Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Study" Cancer(Phila) (1988) Vol. 62, No. 2 p.319-325	1-28, 32-38
A	Nelson, G.O. et al., "Anaplastic Thyroid Carcinoma: Immunohistochemical Study of 32 Cases" Am. J. Clin. Pathol. (1991) Vol. 96, No. 1 p.15-24	1-28, 32-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03054

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29 to 31, 39
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The group of inventions as set forth in claims 29-31 and 39 pertains to diagnostic methods for thyroid cancer and thus falls under the category of diagnostic practiced on the human body. Thus, it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/03054

Continuation of Box No. I of continuation of first sheet (1)

provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCR and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20,
C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takeuchi, T. et al. "Characterization of AE-6 Monoclonal Antibody Recognizing VHCSAGV Sequence in CD45 PTPase Domain" Tissue Antigens (1993) 第42巻 第4号 p. 441	1-14
Y	Michel, S. et al. "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen" J. Exp. Med. (1988) 第168巻 第5号 p. 1523-1530	1-28, 32-38
Y	Michel, S. et al. "Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region" EMBO J. (1992) 第11巻 第3号 p. 897-907	1-28, 32-38

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4 N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Lawrence, P. F. et al. "Monoclonal Antibodies to the Human $\gamma 2$ Subunit of the GABA _A /Benzodiazepine Receptors" J. Neurochem. (1995) 第64巻 第3号 p. 1305-1311	6-26
Y	Faure, P. et al. "Diagnostic Features of Primary Malignant Lymphomas of the Thyroid with Monoclonal Antibodies" Cancer (Phila) (1988) 第61巻 第9号 p. 1852-1861	27-28, 32-38
Y	金光修著「抗体工学入門」株式会社地人書館 (1994) p. 145-166	33-38
A	Shvero, J. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Study" Cancer (Phila) (1988) 第62巻 第2号 p. 319-325	1-28, 32-38
A	Nelson, G. O. et al. "Anaplastic Thyroid Carcinoma: Immunohistochemical Study of 32 Cases" Am. J. Clin. Pathol. (1991) 第96巻 第1号 p. 15-24	1-28, 32-38

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第3条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-31, 39 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 29-31, 39 は、甲状腺癌の診断方法に係る発明であるから、人を診断する方法に該当し、PCT 17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係る発明である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

特 許 協 力 条 約

#11

Prelim. Exam
Report

出願人代理人
角田 嘉弘

あて名
〒 650-0031
兵庫県神戸市中央区東町123番地の1
貿易ビル3階 有古特許事務所

殿

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
[PCT規則71.1]

発送日
(日.月.年)

30.05.00

出願人又は代理人
の書類記号

99P133WO

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P 99/03054

国際出願日

(日.月.年) 07.06.99

優先日

(日.月.年) 08.06.98

出願人 (氏名又は名称)

扶桑薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告 (付属書類を除く) の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に (官庁によってはもっと遅く) 所定の手続 (翻訳文の提出及び国内手数料の支払い) をしなければならない (PCT39条(1)) (様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照)。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/416 (1992年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約


P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 99P133WO	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03054	国際出願日 (日.月.年) 07.06.99	優先日 (日.月.年) 08.06.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12N5/20, C07K16/30, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, A61K39/395		
出願人 (氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 19 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.08.99	国際予備審査報告を作成した日 22.05.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9549

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-3, 5-6, 9-13, 16-18, ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 21-24, 27-31, 33-46 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 4, 7-8, 14-15, 19-20, 25, ページ、 21, 01, 00 付の書簡と共に提出されたもの
 25/1, 26, 32, 47-50
- ☒ 請求の範囲 第 1-39 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-9, 14 ~~ページ/図~~、 出願時に提出されたもの
 図面 第 ~~ページ/図~~、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 10-13 ~~ページ/図~~、 21, 01, 00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-26 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 29-31, 39

理由:

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 29-31, 39 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 29-31, 39 は、ヒトを診断する方法を実質含んでいるから、PCT 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 29-31, 39 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-28, 32-38	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	7-10, 16-19, 27-28, 32-38	有
	請求の範囲	1-6, 11-15, 20-26	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-28, 32-38	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-6, 11-15, 20-26

文献1: J. Exp. Med. 168 [5] (1988) p. 1523-1530

には、ヒトLAR (白血球共通抗原類似分子) をコードするcDNAの塩基配列及びその推定アミノ酸配列が記載されており、このうちアミノ酸配列については、膜貫通領域が図示され、細胞内ドメイン (ホスファターゼドメイン) 及び細胞外ドメインがどこであるかも明確に記載されている。

文献2: EMBO J. 11 [3] (1992) p. 897-907

には、LAR-LCA (白血球共通抗原) の融合蛋白質を発現させて、LARに反応性を有するモノクローナル抗体の特徴付けを行うこと、LARをコードするcDNA配列の一部を欠失させて、細胞外ドメイン (E-サブユニット) と細胞内ドメイン (P-サブユニット) に分割するのに必要な部位を見つけたことが記載されている。

文献3: Tissue Antigens 42 [4] (1993) p. 441

には、CD45 (LCA) のホスファターゼドメイン (細胞内ドメイン) のVHCS AGVを免疫原としてモノクローナル抗体AE-6を作成し、この抗体がCD45のアイソフォームp180と反応したこと、この抗体が細胞質ドメインの微細な相違を識別できることが記載されている。

してみると、文献3により、LCAのホスファターゼドメインの免疫原性が明らかであり、LCAの類似分子であるLARのホスファターゼドメインも同様に免疫原性を有していることが予想されるから、文献1記載のLARホスファターゼドメインの全体またはその一部を文献2記載の方法に基づいて発現させ、得られたポリペプチドを主な免疫原として、文献3記載の抗体の製造方法に基づいて、LARのホスファターゼドメインに対して特異性を有するモノクローナル抗体を作製することは、当業者が容易になし得ることである。このようにして得られたモノクローナル抗体をLAR分子の定量及び単離に使用しようとすることは、当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

手続補正書
(法第11条の規定による補正)

特許庁長官 近藤 隆彦 殿
(特許庁審査官 引地 進 殿)

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99/03054

2. 出願人
名 称

扶桑薬品工業株式会社

FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

あて名

日本国大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
7-10, Dosho-machi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka
541-0045 JAPAN

国 籍

日本国 J A P A N

住 所

日本国 J A P A N

3. 代理人
氏 名

(6586) 弁理士 角 田 嘉 宏

SUMIDA Yoshihiro



あて名

〒650-0031 日本国兵庫県神戸市中央区東町123番地の1
貿易ビル3階

3rd Fl., Boeki Bldg. 123-1, Higashimachi, Chuo-ku,
Kobe-shi, Hyogo 650-0031 JAPAN

4. 補正の対象 明細書及び図面

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5. 補正の内容

- (1) 明細書第4頁11行目の「45」の次に、「のほか」を追加する。
- (2) 明細書第7頁22行目～26行目の「結節性甲状腺種には、～甲状」を、「甲状腺腫瘍には、～（乳頭癌および）」に補正する。
- (3) 明細書第8頁1行目～20行目の「腺腫は～確定的な診断」を、「濾胞癌～判定できる」に補正する。
- (4) 明細書第14頁15行目～16行目の「癌化した甲状腺」を「甲状腺癌」に補正する。
- (5) 明細書第14頁20行目の「甲状腺組織試料」の次に、「（検体）」を追加する。
- (6) 明細書第14頁21行目の「当該組織試料」を「検体」に補正する。
- (7) 明細書第14頁22～23行目、及び25行目2箇所、並びに第15頁6行目及び9行目に「試料」とあるのをすべて「検体」に補正する。
- (8) 明細書第15頁1行目の「従来は」を削除する。
- (9) 明細書第15頁1行目～2行目の「組織を無傷な状態で採取しなければ判定し得ず、そのため」を削除する。
- (10) 明細書第19頁13行目、15行目、及び20行目の「RET」を「Ret」に補正する。
- (11) 明細書第19頁26行目の「RAS」を「Ras」に補正する。
- (12) 明細書第20頁1行目の「RAS」を「ras」に補正する。
- (13) 明細書第20頁10行目の「不活性点」を削除する。
- (14) 明細書第20頁17行目の「腫瘍」を「癌」に補正する。
- (15) 明細書第20頁26行目の「癌化した甲状腺」を「甲状腺癌」に補正する。
- (16) 明細書第25頁9行目の「血流に乗って」を「血行性またはリンパ行性に」に補正する。
- (17) 明細書第25頁10行目の「骨）」の次に「やリンパ節」に補正する。
- (18) 明細書第25頁10行目の「腫瘍」を「癌細胞」に補正する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- (19) 明細書第25頁15行目及び17行目の「もの」を「部位」に補正する。
- (20) 明細書第25頁23行目の「刺激し」を「刺激し」に補正する。
- (21) 明細書第25頁24行目の「広がった」を「進行した」に補正する。
- (22) 明細書第26頁1行目の「首」を「頸部」に補正する。
- (23) 明細書第26頁1行目及び5行目の「腫瘍」を「癌細胞」に補正する。
- (24) 明細書第32頁6行目～7行目の「を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べた」を「のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常甲状腺および癌組織の」に補正する。
- (25) 明細書第32頁9行目の「癌化」を「癌」に補正する。
- (26) 明細書第32頁9行目の「選択的」を「陽性」に補正する。
- (27) 明細書第32頁10行目～11行目の「のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常および癌化甲状腺組織の」を「を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べた」に補正する。
- (28) 明細書第47頁21行目の「甲状腺」の次に、「乳頭」を追加する。
- (29) 明細書第47頁22行目の「癌化した甲状腺組織」を「甲状腺癌」に補正する。
- (30) 明細書第48頁5行目の「癌化細胞組織」を「癌細胞」に補正する。
- (31) 明細書第48頁表1の良性腫瘍の欄にあるグリオーマに係る記載を削除し、これを悪性腫瘍の欄に追加する。
- (32) 明細書第49頁3～4行目の「ここで認められた陽性染色結果は」を「正常の腺細胞にも陽性を示すことから」に補正する。
- (33) 明細書第49頁4行目の「随分」を削除する。
- (34) 明細書第49頁21行目2箇所の「図14」を「図10」に補正する。
- (35) 明細書第49頁22行目の「癌化した甲状腺組織」を「甲状腺癌細胞」に補正する。
- (36) 明細書第49頁23行目、及び第50頁10行目の「吸引バイオプシー」を「穿刺吸引細胞診」に補正する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- (37) 第 1 0 図に「癌化」とあるのを「癌」に補正する。
- (38) 第 1 0 図に「正」とあるのを「陽性」に補正する。
- (39) 第 1 1 及び第 1 2 図に「癌化」とあるのを「癌」に補正する。
- (40) 第 1 1 及び第 1 2 図に「癌腫瘍組織」とあるのを「腫瘍組織」に補正する。
- (41) 第 1 3 図に「癌細胞」及び「腫瘍組織間質」の説明を追加する。

6. 添付書類の目録

- (1) 明細書の第 4、7、8、14、15、19、20、25 / 1、
25 / 2、26、32、47、48、49 及び 50 各頁の新たな用紙
- (2) 第 1 0 図、1 1 図、1 2 図及び 1 3 図の新たな用紙

THIS PAGE BLANK (USPTO)

あった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた (Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988, Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。

- 5 現在までに多くのPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ
今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J.*
Exp. Med., 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*
, 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Bioph.*
ys. Acta, 1095, 46-56, 1991)。PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ膜型
1 0 PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD
45のほか、PTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ および、ならびにLAR)と、(2)細胞
膜貫通部分を持たない細胞質型PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、
STEPおよびPTP1C)とに大別される。

- 膜型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分 (ドメイン 1およびドメ
1 5 イン 2、第1図(a)および(b)参照) を持っている。現在までに報告され
ているPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-
Gly (配列番号: 2) というシステインを含む配列 (signature motif) が
ホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフ
ィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成してお
2 0 り、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接関与している
ことが明らかにされた (Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-
1404, 1994)。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオ
ニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPと
セリン/スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示さ
2 5 れた。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における重要性は、
変異実験から明らかにされている (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.*; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。本発明者らは、これらの状況に鑑み、LARのP-サブユニット、特に細胞内ドメインに特異性を有し、且つCD45に対して特異性を有しない抗体の作製に着手した。

なお、既知のプロテインチロシンホスファターゼに対する抗体としては、CD45の膜貫通領域からホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体 (Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、これらの抗体がLARや、その他プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して如何なる免疫特異性を有するか否かは不明である。ゆえに、CD45に特異性を有さず、LARの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を作製する必要もあった。

甲状腺腫瘍には、良性である甲状腺腫と悪性である甲状腺癌がある。現在、臨床においての甲状腺腫瘍の診断は主に、触診、超音波診断、穿刺吸引細胞診および組織切片による診断が行われている。甲状腺腫瘍は腺腫と乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、髄様癌および悪性リンパ腫等に分類され、また甲状腺癌を大きく分類すると分化型甲状腺癌 (乳頭癌および

THIS PAGE BLANK (USPTO)

濾胞癌)と未分化型甲状腺癌に分類することができる。

5 甲状腺癌の診断には、触診および超音波診断にて異常があった場合、主として患者への負担が少ない穿刺吸引細胞診が行われており、確定診断ができない場合には、甲状腺組織を切除する組織診断が行われている。
10 5。しかし、組織診断の場合には患者への負担が大きく、また正常である組織も切除する可能性がある。実際のところ、細胞診による良性／悪性の鑑別は時に難しく、組織診断に委ねられる場合が多々存在する。また、穿刺吸引細胞診は、組織切片による形態学的観察に比較して細胞と細胞との結合を破壊するため、確定的な診断が下せない。さらに、大部分の濾胞癌においては、細胞診のみならず組織診断を行っても良性と悪性の鑑別が難しいことがある。ゆえに、臨床医あるいは病理医からは穿刺吸引細胞診にて良性／悪性の鑑別を的確に行うことができる方法が望まれており、また、濾胞癌においてもこのような診断困難症例によりの確に判定できる方法が切に望まれていた。

15

[発明の開示]

本発明は、LARのホスファターゼサブユニット、特に細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明によって、LARのホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有、且つ他のプロテインホスファターゼには特異性を有しな

(以下余白)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

また、本発明でさらに企図されるのは、LARおよび／またはLAR由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた *in situ* 免疫組織染色などの技術が採用され、LARのタンパク質、および／または少なくともLARの細胞内ドメインを含む断片もしくはポリペプチドを検出するものである。

本発明はさらに、甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗LAR抗体を企図する。この抗体は、LAR分子のみならず、その断片例えば、ホスファターゼドメイン、細胞外ドメイン等を抗原とした抗体であってよく、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、ペプチド抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR-移植抗体などが含まれる。特に、如上のLARのホスファターゼサブユニットに対する抗体で、甲状腺癌細胞との免疫反応性を有するものが本発明によって提供される。甲状腺癌細胞に対して特異的免疫反応を有するとは、正常の甲状腺細胞や良性腫瘍の甲状腺細胞には殆ど反応せず（正常細胞の約10%以下）、甲状腺癌細胞によく反応する（癌細胞の約20%以上）ことを意味する。

従って、この抗体を利用して、甲状腺癌を診断することが可能になり、本発明において甲状腺癌の組織診断方法を企図するものである。この診断方法は、甲状腺癌への罹患の疑いがある被験者から甲状腺組織試料（検体）を採取し、前記抗体と検体との免疫反応性を評価することによって甲状腺癌の診断を行うことを特徴とする。この場合、甲状腺組織検体は、被験者より注射針等を用いた穿刺吸引細胞診により採取した検体でも、また甲状腺の一部を切除、摘出して調製した甲状腺組織切片等のいかなる検体でもよい。穿刺吸引細胞診により採取した検体を用いる診断方法は、被験者に対する侵襲性が低いという点でより好ましい。これ

（以下余白）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

は、組織形態学的検査に基づく甲状腺癌診断法では、侵襲性の高い切開法を余儀なくされていたことに鑑みて本発明により提供される重要な利点である。なお、組織切片を用いた診断においても、従来の方法よりも格段に診断の信頼性が高いので有用である。

5 前記診断方法において、穿刺吸引細胞診により得られた検体は、本発明の抗体を用いて例えばイムノブロッティング、免疫沈降またはELISA等の、汎用されているin vitroのイムノアッセイによって免疫反応性が評価される。そして、組織切片を検体とした場合、従来の免疫反応を利用した組織染色によって免疫反応性が判定される。

10 さらに本発明は、甲状腺癌の組織診断用組成物であって、上記抗体を含むことを特徴とする組成物を提供する。この組成物を用いて、前記したとおり信頼性の高い甲状腺癌の診断方法を実施することができる。組成物には、本発明の抗体の他に、適宜の賦形剤、担体、緩衝液、抗体を安定化するための薬剤等を配合するとよい。

15 このように、本発明によって、LARが甲状腺癌細胞に特異的に高発現することが判明した。また、実施例に示すように本発明のモノクローナル抗体が甲状腺癌の診断に有用であることも証明された。さらに、本発明のモノクローナル抗体が組織切片を用いた甲状腺癌の診断に有用であり（実施例5、6参照）、また組織をホモジナイズした方法による診断に

20 も有用である（実施例7参照）ことが判明した。以上の結果より、当業者であれば本発明のモノクローナル抗体は種々の細胞診あるいはバイオプシーに有用であることが理解できる。さらに、本発明のモノクローナル抗体のみならず、LAR細胞外ドメインを認識することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および／またはペプチド抗体をも利用

25 することができる。この場合であっても本発明のモノクローナル抗体と

（以下余白）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

本発明はまた、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化（ターゲッティング）されたことを特徴とするDDS製剤を提供する。

甲状腺癌に関与する遺伝子はこれまでに種々明らかにされてきている。乳頭癌患者の一部でRetやTRK遺伝子のチロシンキナーゼドメインの変異が認められた (Fusco, A. et al. ; Nature, 328, 170-2, 1987)。またRetの変異は過去に放射線被曝の既往のない乳頭癌患者の3-30%に見られ (Santoro, M. et al. ; J. Clin. Invest., 89, 1517-22, 1992、Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996、Zou, M. et al. ; Cancer, 73, 176-80, 1994)、チェルノブイリ原発事故の際、被曝した子どもおよび小児時代に放射線の外照射を受けた既往のある患者から診断される乳頭癌では、Retの変異は60-80%と高率に見出され (Fugazzola, L. et al. ; Cancer Res., 55, 5617-20, 1995、Klugbauer, S. et al. ; Oncogene, 11, 2459-67, 1995、Nikiforov, Y. E. et al. ; Cancer Res., et al. ; 57, 1690-4, 1997、Bounacer, A. et al. ; Oncogene, 15, 1263-73, 1997)、TRK遺伝子変異の頻度は極めて低い (Bongdrzone, I. et al. ; J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 2006-9, 1996)。Ras遺伝子の点変異は

THIS PAGE BLANK (USPTO)

甲状腺濾胞癌において高頻度に見られる。これはras遺伝子の点変異は腫瘍発生初期の段階であると考えられている (Fagin, J. A.; Molecular pathogenesis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 7th ed.

- 5 Philadelphia: Lippincott-Raven, 909-16, 1996、Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995) 。TSHや刺激性G蛋白をコードしている遺伝子の活動性変異が一部の甲状腺濾胞癌において報告されている (Challeton, C. et al. ; Oncogene, 11, 601-3, 1995、Russo, D. et

- al. ; Oncogene, 11, 1907- 11; 1995) 。さらに癌抑制遺伝子であるp53の変異は分化型甲状腺癌では希であるが、未分化癌では高頻度に認められることも報告されている (Fagin, J. A. et al. ; J. Clin. Invest., 91, 179-84, 1993、Ito, T. et al. ; Cancer Res., 52, 1369-71, 1992) 。

- 1 5 これら公知の情報から、甲状腺癌の治療または診断を目的とした核酸を、LARに対する抗体によりターゲッティングされたDDS製剤中に含有させることができる。

- また、甲状腺癌細胞の増殖は甲状腺刺激ホルモン (TSH) によって調節されており、甲状腺ホルモン剤投与による甲状腺刺激ホルモン (TSH) 分泌の抑制は、再発や生存率を改善することも知られている。ゆえに、TSHの作用を阻害するようなタンパク質、核酸あるいは化合物もDDS製剤中に含有させることができる。

- 2 0 一方、前記の甲状腺癌細胞に対する特異的免疫反応性を有する抗体を用いて、甲状腺癌細胞に対して標的化されたことを特徴とする本発明のDDS製剤中に、核酸、ヨード、放射性ヨード、テクネチウムおよびタンパク質よりなる群から選択される1以上の物質を含んでいてもよく、かような物質を製剤中に配合することによって、甲状腺癌細胞への標

THIS PAGE BLANK (USPTO)

に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。
 十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合にはin vitroで抗原感作を行うこともできる。

上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

また、そのような抗体をヨードで放射標識するあるいは抗体でターゲティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、診断・治療薬として有用性が増す場合がある。

乳頭癌や濾胞癌が一度血行性またはリンパ行性に周囲の組織、または離れた部位(特に肺と骨)やリンパ節に転移した場合、癌細胞を破壊するために放射性ヨード(^{131}I)を投与するのが一般的な治療となっている。正常甲状腺細胞は血液からヨードを取り込み濃縮する。そしてこの過程は下垂体からのTSH(甲状腺刺激ホルモン)により刺激される。その後ヨードは甲状腺ホルモン(サイロキシンT₄)を作るのに使われる。上記述べたように、甲状腺癌または甲状腺癌が転移した部位は、正常な場合はごくわずかの量のヨード(または放射性ヨード)しか取り込まない。しかし、大量のTSHの影響下にある時は、甲状腺癌、またはその転移した部位の一部は刺激を受けて、相当量のヨードを取り込むようになる。これにより、周囲の組織を損なうことなく、癌に直接大量の放射線が照射されることになる。甲状腺が存在しており、正常な量の甲状腺ホルモンを産生している場合は、下垂体のTSHの産生量は比較的低いままに留まっているが、甲状腺全体が取り除かれたり、破壊されたりして甲状腺ホルモンのレベルが下がると下垂体はTSHの分泌を急激に増加する。このTSHが甲状腺癌を刺激し、放射性ヨードを取り込むようにする。進行した甲状腺癌に対し、放射性ヨード療法を行なう場合は、甲状腺全体を手術でほぼ完全に取り除き、残留した組織を放射性ヨードを使って破壊する必要がある

THIS PAGE BLANK (USPTO)

。一度これを行なったら

(以下余白)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

、頸部に癌細胞が残っているか、離れた場所に転移があることがわかって
 いる患者には、TSHのレベルが十分に高ければ、試験量の放射性ヨード
 (通常は約2から10ミリキュリー)を使ってスキャンを行う。もし、相当
 量のヨードが甲状腺癌の領域に集まっていれば、さらに大量の治療量の
 5 放射性ヨード(通常100-200ミリキュリー: 3700から7400MBq)を与え、癌
 細胞の破壊を試みる。より浸潤性の強い甲状腺癌のある患者に対しても
 、放射性ヨードが安全で有効であるため、多くの医師がそれ程浸潤性の
 強くない乳頭癌や濾胞癌にも、放射性ヨードを日常的に使うようになって
 いる。

1 0 ゆえに、LARに結合する抗体をヨード標識する、あるいは抗体でターゲ
 ティングさせた医薬組成物中に放射性ヨードを含有させることにより、
 さらに甲状腺癌細胞への特異性を増強し、治療または診断に用いること
 ができる。

この様に甲状腺癌細胞を特異的に認識する抗LAR抗体はドラッグデリバ
 1 5 リーシステム(Drug Delivery System: DDS)においても有用である。ドラ
 ッグデリバリーシステム(橋田充: ドラッグデリバリーシステム 創薬と
 治療への新たな挑戦, 化学同人(1995))は、薬物の投与方法や形態を
 工夫し、体内での薬物動態を制御することにより薬物を標的部位に選択
 的に送り込み、結果として最適の治療効果を得、さらに薬物による副作
 2 0 用を最小限にとどめることを目的とした薬物投与に関する新しい技術で
 ある。現在までに様々な DDS製剤が開発されているが、なかでもリボソ
 ーム製剤(寺田弘, 吉村哲朗編: ライフサイエンスにおけるリボソーム
 実験マニュアルシェプリンガー・フエアラーク東京(1992))は欠損酵素の
 補充、抗癌剤および抗生物質の投与、さらには遺伝子治療の分野におい
 2 5 ても脚光を浴びている。

リボソームは生体膜を構成しているリン脂質を基本とする脂質二重層

7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第8図は、インスリンレセプターチロシンキナーゼによるLARのリン酸化を示すイムノブロットを表す図である。

第9図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

第10図は、本発明の抗体YU1のヒト甲状腺癌組織に対する特異的免疫反応性を調べた、正常甲状腺および癌組織のイムノブロッティングの結果を示す図である。

第11～13図は、本発明の抗体YU1を用いたヒト甲状腺癌組織切片の免疫染色における、癌細胞の陽性染色結果を示す図である。

第14図は、本発明の抗体YU1を用いてマウスにおけるLARの組織分布を調べたイムノブロッティングの結果を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

[実験例1] LAR変異体によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化ならびにLARとインスリンレセプターとの会合に関する検討

先ず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするために、LARのPTPドメインの触媒活性中心に存在するシステインをセリンに変換することにより作製した、変異型LARを用いるというストラテジーにより解析を進めた。

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

LAR発現ベクターとして、(a) LAR WT：ヒト野生型LAR（配列番号：3）、(b) LAR C/S：LAR-PTPドメイン1の活性中心にあるシステイン（配列番号：3のアミノ酸第1522位）を、配列番号：3のヌクレオチド第4983位のGをCに置換することによりセリンへと変換したもの、ならびに(c) LAR DC/S：LAR C/Sにおける変異に加えて、さらにLAR-PTPドメイン2の

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(原液を1000倍希釈)を滴下後、そのまま湿潤箱の中で90分間放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄した後、二次抗体 (ビオチン化抗マウスイムノグロブリン) を滴下し
5 45分放置した。

その後、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄し、ストレプトアビジン接合セイヨウワサビペルオキシダーゼを滴下後、25分放置した。

次に、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で十分に洗浄後、0.02% 過酸化水素および0.15M NaCl を含む0.05%DAB (3,3'-ジ
10 ミノベンチジン四塩酸)の50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) を滴下し、顕微鏡下で発色を確認し、水の中にスライドガラスを浸すことによって反応を停止させた。

反応停止後、マイヤーのヘマトキシリンに5-10秒間浸し、後染色を行
15 った。その後、水洗し、100%エタノールに1分間×2回、100%キシレンに1分間×2回浸した後、マリノールで封入し、観察した。

尚、ブロッキング、二次抗体、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ溶液はDAKO Japan Co. Ltd., (Kyoto)のLSAB キットを用い、DABはDojindo(Kumamoto)の試薬を、MalinolはMuto Pure Chemicals Ltd.,
20 (Tokyo)を、マイヤーのヘマトキシリンは自作のものを使用した。

こうして得られた甲状腺乳頭癌細胞の免疫染色の結果を図11～13に示す。これらの図から、甲状腺癌細胞にYU1抗体が選択的に結合し (褐色染色部)、正常の濾胞細胞および腫瘍組織の間質には結合しない (青色染色部) ことが判る。

25 従って、この抗体を用いて甲状腺癌の組織切片染色による診断が可能であること、さらにはこの抗体が抗癌剤 (化学療法剤) を含むDDSシステ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ムにおいて有用であることも明らかになった。

〔実施例 6〕 他の良性腫瘍細胞および癌細胞組織の免疫染色

実施例 5 に記載したと同様の手順により、以下の表 1 に示す種々の良
5 性腫瘍細胞および癌細胞（ヒト由来）の免疫染色を実施した。

YU1 抗体との結合性に基づく染色が認められたものを陽性として、その
割合を以下の表 1 に示す。

表 1

腫瘍		症例	陽性例数	陽性率
良 性	髄膜腫	10	0	0
	甲状腺腺腫	10	0	0
悪 性	甲状腺癌	21	21	100
	グリオーマ	13	1	7.7
	胃癌	16	1	6.3
	大腸癌	26	13	50
	肺癌	20	2	10
	乳癌	20	3	15
	肝癌	8	0	0
	腎癌	21	0	0
	前立腺癌	32	2	6.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

この結果、甲状腺癌での陽性率は100%であり、良性腫瘍やその他の臓器の癌では陽性率が低いか、または完全に陰性であることが明らかになった。大腸癌で比較的高い陽性率が示されているが正常の腺細胞にも陽性を示すことから、甲状腺癌におけるものと異なっており、顕著な染色が認められた甲状腺癌細胞に対するYU1の特異的免疫反応性が示唆された。

〔実施例7〕 YU1による甲状腺癌の特異的免疫反応：イムノアッセイ利用可能性の検討

10 実施例5で使用したヒト甲状腺癌組織および正常組織各1gに対し、冷細胞溶解用バッファー（同上） 3ml を加え、氷上でポリトロンを用いてホモジナイズした後、氷上で30分間インキュベートした。4℃、15,000g、20分間遠心後、上清を回収し、同じ条件で再度遠心して得た上清を用いた。タンパク定量はDC Protein Assay（バイオラッド）のマニュアルに従って行った。

得られた上清（タンパク質1 mgに相当）、あるいは 陽性対照として、COS-7細胞にヒトLARをトランスフェクトし、抗LAR抗体を用いて免疫沈降したもの（実験例1 a～cに記載の手順に従って、調製）を電気泳動後、実験例1、e欄に記載した方法に従ってYU1を用いてイムノブロットを行った。検出にはImmunoStar Reagents（和光純薬工業）を用いた。

こうして得られた結果を図10に示す。図10に示されるとおり、YU1は正常の甲状腺細胞と異なり、甲状腺癌細胞を特異的に認識することが明らかになった。従って、甲状腺の穿刺吸引細胞診によって得られる組織試料を甲状腺癌の診断に利用できることが判った。

25

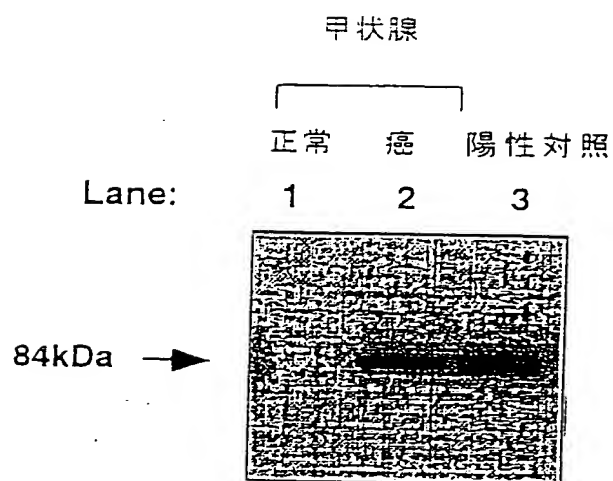
〔産業上の利用可能性〕

THIS PAGE BLANK (USPTO)

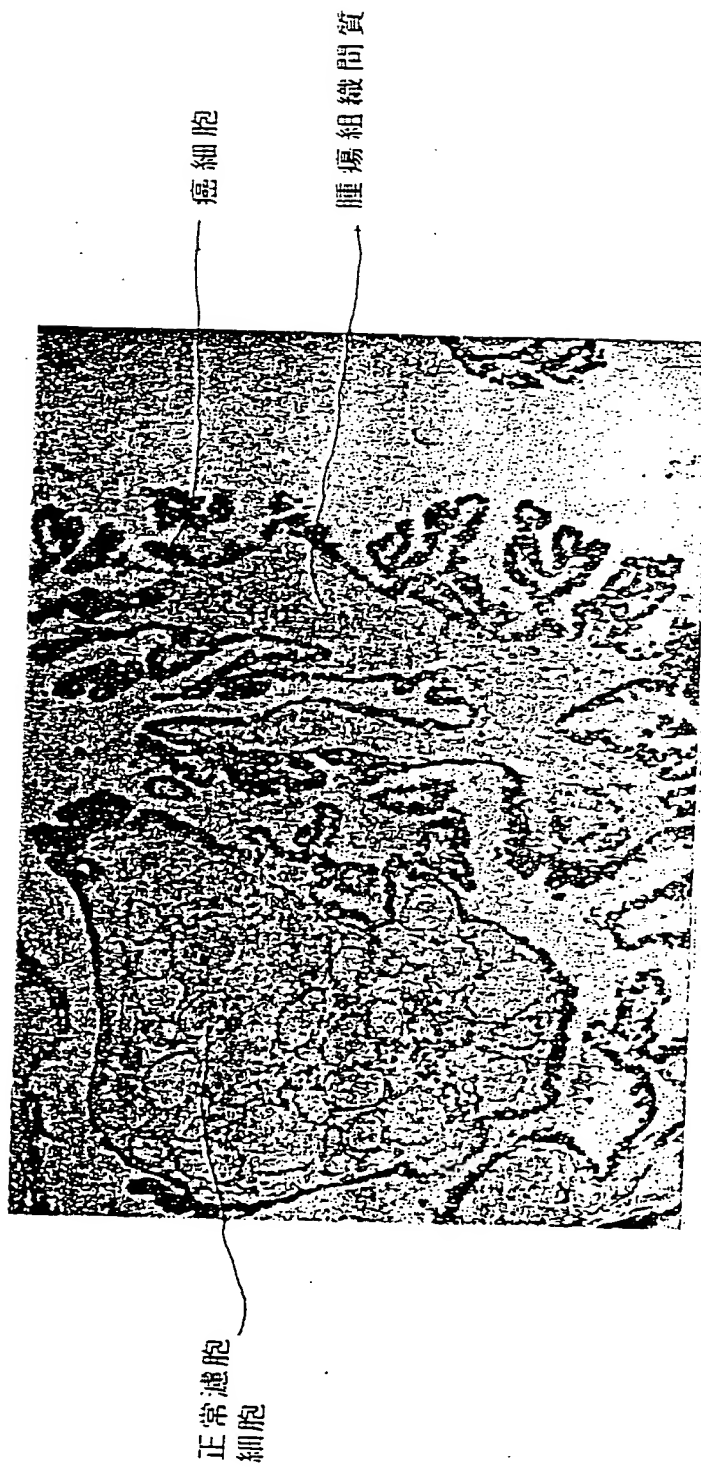
本発明によって提供される、LARのホスファターゼサブユニットに対する抗体は、ホスファターゼ活性を有するLARの細胞内ドメインを特異的に認識することができる。従って、この抗体は、インスリンのシグナル伝達機構を解明したり、LARのモジュレーターや結合タンパク質等を同定、
5 取得するために極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防および診断ならびに動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に応用できる。

さらに本発明の抗体は、甲状腺癌に対する特異的免疫反応性を有する
1 0 のので、穿刺吸引細胞診や組織切片を用いた甲状腺癌の診断、甲状腺癌治療のためのDDSを利用した医薬組成物などに有用であり、また、甲状腺癌細胞におけるLAR分子の転写、翻訳レベルでの発現調節因子の分子生物学的研究にも貢献することができる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

癌細胞

腫瘍組織間質

正常濾胞
細胞



THIS PAGE BLANK (USPTO)

癌細胞



腫瘍組織間質

THIS PAGE BLANK (USPTO)